
Analyse von zwei strukturell ähnlichen aber funktionell unterschiedlichen viralen K⁺-Kanälen: Strukturelle Ursache der inhärenten Einwärtsgleichrichtung

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von

Denise Eckert, M.Sc.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Adam Bertl

Darmstadt 2018

Eckert, Denise: Analyse von zwei strukturell ähnlichen aber funktionell unterschiedlichen viralen K⁺-Kanälen: Strukturelle Ursache der inhärenten Einwärtsgleichrichtung

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-83209

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2018

Veröffentlicht unter CC BY-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

„Nur wer sich auf den Weg macht,
wird neues Land entdecken!“

Hugo von Hofmannsthal

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Summary	8
1. Einleitung	10
1.1. K ⁺ -Kanäle	10
1.1.1. Aufbau und Struktur von K ⁺ -Kanälen	11
1.1.2. Leitfähigkeit und Selektivität der K ⁺ -Kanäle	14
1.2. Virale K ⁺ -Kanäle	23
1.2.1. Kmpv-Kanäle	25
1.3. Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Chemikalien	27
2.2. Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten	27
2.3. Mutagenese	27
2.4. Zellkultur	29
2.5. Patch-Clamp Technik	30
2.6. Lipid-Bilayer Technik	31
2.7. Software	33
2.8. Statistik	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Kmpv _{SP1} - ein intrinsischer Einwärtsgleichrichter	36
3.1.1. Kmpv _{SP1} ist sensitiv für typische K ⁺ -Kanalblocker	47
3.1.2. Die Selektivität von Kmpv _{SP1} für Rb ⁺ und Na ⁺	52
3.2. Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁ - Unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften, trotz ähnlicher Struktur	55
3.2.1. Sensitivität für Ba ²⁺	55
3.2.2. Die Transmembran-Helices sind verantwortlich für die hohe Cs ⁺ -Sensitivität des Kmpv _{SP1}	62
3.2.3. Die Transmembran-Helices sind verantwortlich für die unterschiedliche Rb ⁺ -Leitfähigkeit	66
3.3. Bestimmung des inhärenten Faktors des intrinsischen Einwärtsgleichrichters Kmpv _{SP1}	71
3.3.1. Strukturuntersuchungen des viralen K ⁺ -Kanals Kmpv _{SP1} durch Punktmutationen	73
3.3.2. Strukturuntersuchungen des viralen K ⁺ -Kanals Kmpv _{SP1} durch Chimären	88
4. Diskussion	97
4.1. Die Transmembran-Helices bestimmen die Rb ⁺ -Leitfähigkeit und sind verantwortlich für die Cs ⁺ -Sensitivität	99
4.2. Die Bariumbindestelle	104

4.3.	Die Einwärtsgleichrichtung	108
4.4.	Ausblick	116
5.	Literaturverzeichnis	117
6.	Abbildungsverzeichnis	124
7.	Tabellenverzeichnis	127
8.	Abkürzungsverzeichnis	128
9.	Anhang	131
9.1.	Mittlere Ströme und RIs bei -100 mV	131
9.2.	Primer-Sequenzen	132
9.3.	Basensequenzen und Aminosäure-Sequenzen	136
9.3.1.	Kmp _{VSP1}	136
9.3.2.	Kmp _{V1}	136
9.3.3.	Kmp _{VPL1}	136
9.4.	Übersicht der Chimären	137
9.5.	Aminosäuren	138
10. ..	Eigene Arbeit	139
11. ..	Ehrenwörtliche Erklärung	140
12. ..	Curriculum Vitae	141
13. ..	Danksagung	143

Zusammenfassung

Viren besitzen kodierende Sequenzen für Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle), welche die gleichen strukturellen und funktionellen Merkmale wie komplexere K^+ -Kanäle aus Pro- und Eukaryonten aufweisen. So wie Letztere verfügen sie ebenfalls über Transmembran-Helices (TMs), eine kanonische Porenregion (Poren-Loop), welche zwei TMs miteinander verbindet und die typische Signatursequenz beinhaltet. In einigen Fällen sind auch sehr kurze zytoplasmatische C- und N-Termini vorhanden. Die bisher bekannten viralen K^+ -Kanäle sind alle aus zwei TMs, welche über die Porenregion verbunden sind, aufgebaut. Anders als die baugleichen Kir-Kanäle zeichnen sich die viralen Kanäle jedoch über eine sehr geringe Größe aus. In Abwesenheit von großen zytosolischen Domänen sind sie in der Lage mit weniger als 100 Aminosäuren funktionelle Kanäle zu bilden. Wegen der Kombination aus robuster Kanalfunktion und geringer Größe eignen sie sich hervorragend als Modellsystem, um grundlegende Struktur- und Funktionsanalysen durchzuführen, welche auf komplexere K^+ -Kanäle übertragen werden können.

In dieser Arbeit wurden die Kmpv-Kanäle (K^+ -Kanal *Micromonas pusilla virus*), welche zu der Familie der Phycodnaviren gehören, untersucht. Kmpv_{SP1}, welcher aus dem *Micromonas pusilla virus SP1* isoliert wurde, zeigt nach Expression in HEK293-Zellen sowohl in der *whole-cell* Konfiguration, als auch nach Rekonstitution in einen planaren Lipid-Bilayer eine Einwärtsgleichrichtung. Diese Gleichrichtung ist nicht, wie bei Kir-Kanälen, auf einen intrazellulären Block zurückzuführen. Kmpv_{SP1} leitet auch in einer reinen K^+ -Lösung fast ausschließlich Einwärtsstrom, woraus zu schließen ist, dass die Gleichrichtung eine intrinsische Eigenschaft des Kanalproteins ist. Obwohl die molekularen Mechanismen der Gleichrichtung unterschiedlich sind, zeigt Kmpv_{SP1} dennoch einige charakteristische Funktionseigenschaften von Kir-Kanälen. Wie bei den letztgenannten Kanälen verschiebt sich nach einer Veränderung der externen K^+ -Konzentration die Gleichrichtung mit dem Umkehrpotential. Auch im Falle des viralen Kanals hängt dabei die Leitfähigkeit von der Quadratwurzel der externen K^+ -Konzentration ab.

Ein zweiter viraler Kanal aus dieser Familie, Kmpv₁ (K^+ -Kanal *Micromonas pusilla virus 1*), welcher eine sehr ähnliche Aminosäure-Sequenz zu Kmpv_{SP1} aufweist, zeigt ein völlig anderes elektrophysiologisches Verhalten. Dieser Kanal hat keine Gleichrichtereigenschaften, sondern zeigt eine ohmsche K^+ -Leitfähigkeit. Kmpv₁ weist ferner eine niedrigere Sensitivität für die typischen K^+ -Kanalblockern Ba^{2+} und Cs^+ auf und besitzt eine deutlich höhere Leitfähigkeit für Rb^+ als K^+ . Im Vergleich dazu ist der Einwärtsgleichrichter Kmpv_{SP1} sehr sensitiv für Ba^{2+} und Cs^+ und leitet deutlich weniger Rb^+ als K^+ . Aufgrund der elektrophysiologischen Unterschiede

wurden die beiden viralen K^+ -Kanäle als Werkzeug benutzt, um die Struktur-Funktionsbeziehung, die für die unterschiedlichen Funktionseigenschaften verantwortlich sind, zu analysieren. Durch kombinierte Mutations- und Funktionsanalysen kann die unterschiedliche K^+ - und Rb^+ -Leitfähigkeit und die unterschiedliche Sensitivität für Cs^+ auf die TMs zurückgeführt werden. Diese geht auf den Befund zurück, dass eine Chimäre, welche die TMs aus Kmpv_{SP1} und die Pore aus Kmpv₁ vereint, eine niedrige Rb^+ -Leitfähigkeit, eine hohe Sensitivität für Cs^+ und eine deutliche Einwärtsgleichrichtung für K^+ zeigt. Das entspricht den funktionellen Eigenschaften von Kmpv_{SP1}, also dem Teil des Kanals, der die TMs zu der Chimäre beisteuert.

Für die hohe Ba^{2+} -Sensitivität in Kmpv_{SP1} kann hingegen die Struktur der Pore und zwar die Aminosäure Serin (53) hinter dem GYG-Motiv verantwortlich gemacht werden. Durch die Substitution dieser Aminosäure durch Phenylalanin, welche Kmpv₁ an vergleichbarer Stelle trägt, kann die Sensitivität der Mutante auf das Niveau der Sensitivität des Wildtyp-Kanals Kmpv₁ gesenkt werden.

Der Mechanismus der Einwärtsgleichrichtung von Kmpv_{SP1} kann in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die Experimente schließen jedoch die Pore als primäre Struktur für die Gleichrichtung aus. Ein Austausch der Pore in Kmpv_{SP1}, durch die entsprechende Domäne des Kanals mit ohmscher Leitfähigkeit, führt nicht zum Verlust der Gleichrichtung.

In weiteren Untersuchungen wurden diejenigen Aminosäuren, in denen sich der Kmpv_{SP1} Kanal von Kmpv₁ unterscheidet, so mutiert, dass sie dem Kmpv₁ gleichen. Aus der Analyse von 22 funktionellen Punktmutanten ergab sich nur eine Mutante, Kmpv_{SP1} F72I, bei der die makroskopischen Ströme zwar sehr klein, aber nicht mehr einwärtsgleichrichtend waren. Nach einer funktionellen Rekonstitution der Mutante in planaren Lipid-Bilayern zeigte der Kanal, anders als der Wildtyp-Kanal, Kanalfluktuationen im positiven Spannungsbereich. Auch wenn diese Mutation das Schaltverhalten des Kanals verändert, kann die Aminosäure F72 nicht als einzige Ursache für die Gleichrichtung interpretiert werden. Auch die F72I Mutante zeigt immer noch eine Einwärtsgleichrichtung mit einer höheren Offenwahrscheinlichkeit bei negativen im Vergleich zu positiven Spannungen. Zudem hat die gleiche Mutation in einem nahe verwandten K^+ -Kanal von Kmpv_{SP1} dem Kmpv_{PL1}, keinerlei Auswirkung auf die Gleichrichtereigenschaften.

Summary

Viruses have coding sequences for potassium channels (K^+ channels), which have the same structural and functional characteristics of more complex K^+ channels from pro- and eukaryotes. Like the latter, they also have transmembrane domains (TMs), a canonical pore region that connects two TMs and the typical signature sequence; in some cases, very short cytoplasmic C- and N-termini are also present. The viral K^+ channels known so far are all composed of two TMs, which are connected via the pore region. Unlike Kir channels, which exhibit the same architecture, the viral channels have a very small size. In the absence of large cytosolic domains, they are able to form functional channels with less than 100 amino acids. This combination of robust channel function and small size make them ideal model systems for basic structural and functional analyses that can be transferred to more complex K^+ channels.

In this work the Kmpv channels (K^+ channel *Micromonas pusilla virus*), which belong to the family of Phycodnaviruses, were investigated. Kmpv_{SP1}, isolated from *Micromonas pusilla virus SP1*, shows an inward rectification. This occurs in whole-cell recordings after expression of the channel in HEK293 cells and after reconstitution of the channel protein in a planar lipid bilayers. This rectification is not, as with Kir channels, due to an intracellular block. Kmpv_{SP1} also conducts almost exclusively an inward current in a pure K^+ solution. This underscores that the rectification is an intrinsic property of the channel protein. Although the molecular mechanisms of rectification are different, Kmpv_{SP1} nevertheless shows some characteristic functional properties of Kir channels. As with the latter channels a change in the external K^+ concentration causes a shift of the rectification with the reversal potential. Like in Kir channels, the conductivity of the viral channel also depends on the square root of the external K^+ concentration.

A second viral channel, Kmpv₁ (K^+ channel *Micromonas pusilla virus 1*), which has a very similar amino acid sequence to Kmpv_{SP1}, shows a different electrophysiological behavior. This channel has no rectifier properties but exhibits an ohmic K^+ conductivity. Kmpv₁ also has a lower sensitivity to the typical K^+ channel blockers Ba^{2+} and Cs^+ and a significantly higher conductivity for Rb^+ compared to K^+ . The inward rectifier Kmpv_{SP1} in contrast is very sensitive to Ba^{2+} and Cs^+ and conducts significantly less Rb^+ than K^+ . Because of the electrophysiological differences, the two viral K^+ channels were used as a tool to analyze the structure/function correlates responsible for the different functional properties. A combination of mutational and functional studies showed that the different K^+ and Rb^+ conductivity and the different sensitivity to Cs^+ are related to the structure of the TMs. This is supported by the finding that a chimera combining the TMs of Kmpv_{SP1} and the pore of Kmpv₁ shows a low Rb^+ conductivity,

a high sensitivity to Cs^+ and a clear inward rectification for K^+ . This corresponds to the functional properties of Kmpv_{SP1} , the part of the channel that contributes the TMs in the chimera. The high Ba^{2+} sensitivity in Kmpv_{SP1} in contrast can be attributed to the structure of the pore, namely the amino acid serine (53) behind the GYG motif. By substituting this one amino acid with phenylalanine, e.g. the amino acid present at this position in Kmpv_1 , the sensitivity of the mutant can be reduced to the level of the wild-type channel Kmpv_1 .

The mechanism of inward rectification of Kmpv_{SP1} cannot be fully clarified in this work. However, the experiments exclude the pore as the primary structure responsible for the rectification. Replacing the pore in Kmpv_{SP1} by the corresponding domain of the channel with ohmic conductivity does not lead to loss of rectification. In further investigations, the amino acids in which the Kmpv_{SP1} channel differs from Kmpv_1 were mutated to resemble Kmpv_1 . The analysis of 22 functional point mutants resulted in only one mutant, F72I, in which the macroscopic currents were very small, but no longer inwardly rectifying. After functional reconstitution of the mutant in planar lipid bilayers, the channel showed channel fluctuations in the positive voltage range, unlike the wild type channel. Even though this mutation apparently changes the gating of the channel, the amino acid F72 cannot be interpreted as the cause for the rectification. Also, the F72I mutant still shows an inward rectification with a higher open probability at negative compared to positive stresses. Furthermore, the same mutation in a close relative of Kmpv_{SP1} the Kmpv_{PL1} channel, has no effect on the rectifier properties.

1. Einleitung

1.1. K⁺-Kanäle

Jede Zelle ist von einer Plasmamembran umgeben, die das Innere der Zelle von der äußeren Umgebung abgrenzt. Diese Zellmembran ist besonders für Ionen impermeabel, so dass integrale Membranproteine erforderlich sind, um den Transport von Ionen über die Plasmamembran zu katalysieren. Zu diesen Membranproteinen zählen zum Beispiel (z. B.) die Ionenkanäle, welche für den passiven Ionentransport über die Zellmembran verantwortlich sind. Sie setzen die Energie, welche benötigt wird, um ein Ion über die Plasmamembran zu leiten, um das 20-fache herab (Parsegian, 1969; Bernèche und Roux, 2001). Dies gleicht der freien Diffusion von Wasser (Hille, 2001). Um den Transport der Ionen über die Plasmamembran zu kontrollieren, sind die Ionenkanäle in der Lage, sich zu öffnen und zu schließen. Außerdem weisen sie eine hohe Selektivität für bestimmte Ionen auf, so leiten Kaliumkanäle (K⁺-Kanäle) Kalium-Ionen (K⁺) bis zu 10.000-mal besser als Natrium-Ionen (Na⁺) (Doyle *et al.*, 1998).

K⁺-Kanäle kommen in allen Lebensformen vor und spielen eine wichtige Rolle in erregbaren und nicht erregbaren Zellen. So findet man sie z.B. in Nervenzellen, wo sie an der Reizweiterleitung beteiligt sind (Hille, 1978.). Aber auch für viele andere physiologische Vorgänge sind sie fundamental. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass sie eine große Rolle beim Auftreten von Krankheiten spielen. So führt z.B. eine Mutation des ATP-sensitiven K⁺-Kanals (K_{ATP}-Kanals) in den Pankreaszellen zu einer Störung in der Freisetzung des Hormons Insulin, was eine Ursache für die Entstehung von Diabetes sein kann (Koster *et al.*, 2005). Aber auch Krankheiten, wie Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck, Epilepsie, Asthma, multiple Sklerose, Migräne und Angina pectoris, sind auf einen Defekt von K⁺-Kanälen zurückzuführen (Ashcroft, 2000). Diese Krankheiten, welche durch Defekte in Ionenkanälen verursacht werden, werden unter dem Begriff *Channelopathien* zusammengefasst (Ashcroft, 2000). Daher eignen sich K⁺-Kanäle als *Target* für Medikamente, um die physiologische Funktion des K⁺-Kanals wieder zu gewährleisten. Als Beispiel sei hier der Zusammenhang zwischen Kanalfunktion und Herzrhythmusstörungen genannt. So ist bekannt, dass eine Mutation des Kv11.1, welcher sich im Herzen befindet, verantwortlich für das *Long QT-Syndrom* (LQTS) ist, wodurch es durch eine Verlängerung der QT-Zeit, zum plötzlichen Herztod kommen kann (Goldenberg *et al.*, 2008). Durch Kanal-Blocker, welche den Kv11.1 blockieren, kann diese Arrhythmie behandelt werden (Wulff *et al.*, 2009).

1.1.1. Aufbau und Struktur von K⁺-Kanälen

Alle K⁺-Kanäle weisen im Wesentlichen eine gleiche Grundstruktur auf. Eine Untereinheit besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl von Transmembran-Helices (TMs) und der Poren-Helix. In Abbildung 1.1 ist der K⁺-Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans* im geschlossenen Zustand dargestellt (Doyle *et al.*, 1998). Dieser besteht pro Untereinheit aus nur zwei TMs, TM1 und TM2, wobei TM1 auch als innere und TM2 als äußere TM bezeichnet werden. Die TMs sind durch die Porenregion (Poren-Loop) verbunden, diese beinhaltet die Poren-Helix und den Selektivitätsfilter. Nach Oligomerisierung der vier Untereinheiten zu einem Tetramer, bilden sie einen funktionellen K⁺-Kanal aus (Abbildung 1.1 B). In der Mitte des Tetramers befindet sich die Pore, durch welche K⁺ geleitet wird (Doyle *et al.*, 1998; Sansom *et al.*, 2002).

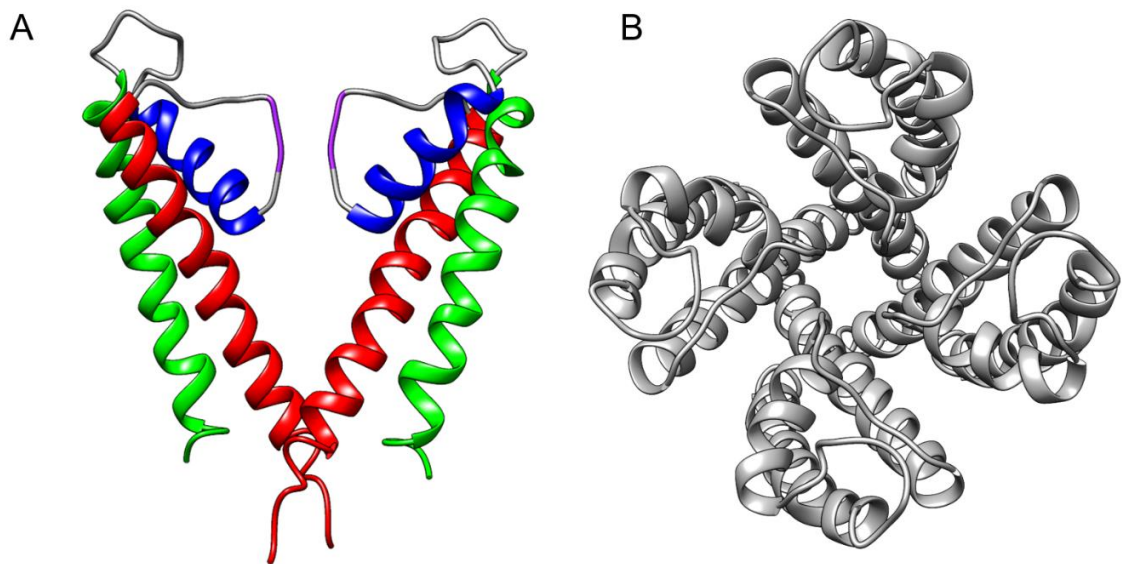


Abbildung 1.1: Vereinfachter Aufbau eines K⁺-Kanals mit zwei TMs. In A sind zwei der vier Untereinheiten (Seitenansicht) des K⁺-Kanals KcsA aus *Streptomyces lividans* dargestellt (PDB: 1BL8, Doyle *et al.*, 1998). Eine Untereinheit besteht aus zwei TMs, TM1 (rot) und TM2 (grün), welche durch die Porenregion (grau), bestehend aus der Poren-Helix (blau) und dem GYG-Motiv (lila), verbunden sind (Doyle *et al.*, 1998 und Sansom *et al.*, 2002). In B ist KcsA als Tetramer (Aufsicht) dargestellt. In der Mitte bildet sich die Pore aus.

Je nach Aufbau und Anzahl der TMs kann man die K⁺-Kanäle in unterschiedliche Gruppen einteilen (Abbildung 1.2) (Thiel *et al.*, 2011). So bestehen die einfachsten K⁺-Kanäle aus nur zwei TMs je Untereinheit, die durch die Poren-Helix verbunden sind (Abbildung 1.2). Vier dieser Untereinheiten bilden einen funktionellen K⁺-Kanal aus. Zu diesen einfach aufgebauten K⁺-Kanälen zählen z.B. die K⁺ *inward rectifier*- Kanäle (Kir-Kanäle) (Hibino *et al.*, 2010) oder

die bakteriellen K⁺- Kanäle KirBac und KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2003). Andere K⁺-Kanäle weisen pro Untereinheit sechs TMs auf, wobei die Porenregion zwischen der fünften und sechsten TM liegt (Abbildung 1.2). Die spannungsabhängigen K⁺-Kanäle (Kv), z.B. der Kv 1.2, zählen zu dieser Familie und besitzen einen Spannungssensor in der vierten TM (Long *et al.*, 2005). Im Spannungssensor sind viele positive Aminosäuren enthalten, welche sich bei Änderungen der Membranspannung durch das elektrische Feld bewegen, wobei es so durch Konformationsänderung zum Öffnen und Schließen des Kanals kommt (Benzanilla, 2000; Hille, 2001; Yellen, 2002). Außerdem gibt es sogenannte Tandem-Kanäle, bei diesen bilden zwei Untereinheiten einen funktionellen Kanal aus. Das besondere an diesen Kanälen ist, dass sie pro Untereinheit über vier TMs verfügen, wobei die erste und zweite TM und die dritte und vierte TM jeweils durch eine Poren-Helix verbunden sind (Abbildung 1.2). Diese nennt man auch *Two-Pore domain (K2P)* K⁺-Kanäle (Lesage and Lazdunski, 2000). Ein Beispiel hierfür ist der TWIK-1, welcher aus dem menschlichen Genom isoliert wurde (Lesage *et al.*, 1996). Ferner gibt es noch Tandem K⁺-Kanäle, die aus acht TMs mit zwei Poren-Helices bestehen (Abbildung 1.2). Ein Beispiel für solch einen K⁺-Kanal ist der TOK1-Kanal aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ahmed *et al.*, 1999).

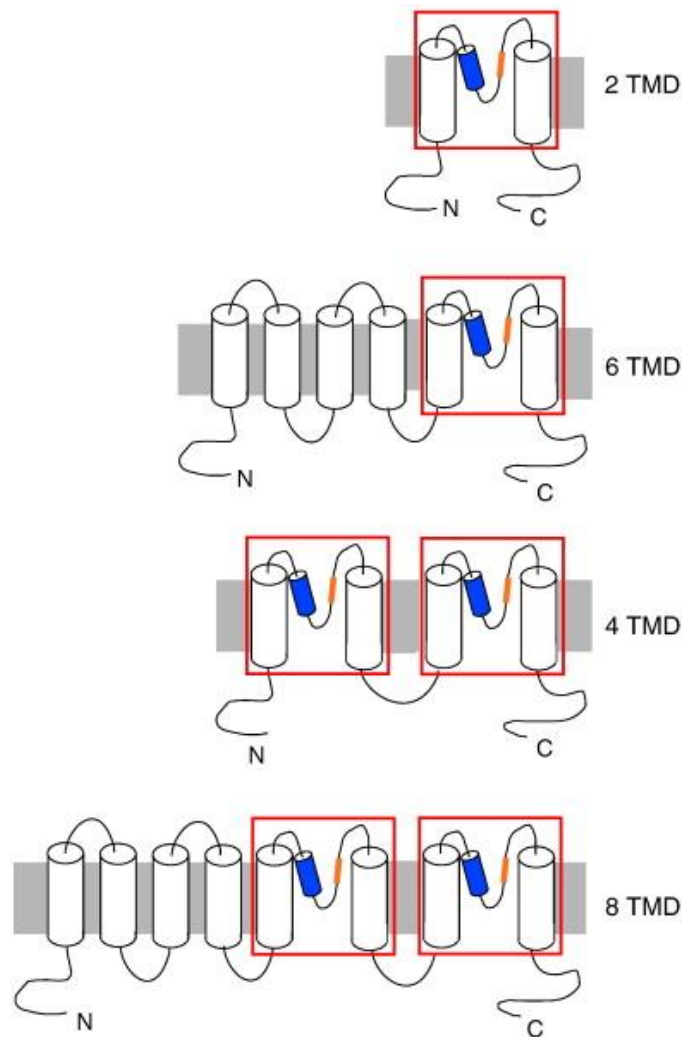


Abbildung 1.2: Untereinheiten der K⁺-Kanäle. K⁺-Kanäle bestehen aus zwei bis acht TMDs je Untereinheit. Die TMDs sind mit Hilfe von Zylindern, die Poren-Helix ist in blau und der Selektivitätsfilter in orange dargestellt. Die funktionelle Einheit, welche im gesamten K⁺-Kanal die Pore ausbildet, ist mit einem roten Kasten eingerahmt (Thiel *et al.*, 2011).

Die hohe K⁺-Selektivität wird im Selektivitätsfilter bestimmt. Alle bekannten K⁺-Kanäle weisen in der Porenregion eine sehr hoch konservierte Domäne mit der gleichen Aminosäure-Sequenz, -TXXTXGY/FG, auf. Diese Aminosäure-Sequenz wird auch als Signatursequenz bezeichnet (Heginbotham *et al.*, 1994). In Abbildung 1.3 A ist der K⁺-Kanal KcsA als einfaches Modell mit zwei Untereinheiten und in B die wassergefüllte Pore, durch welche K⁺ hindurchgeleitet wird, dargestellt. Es wird deutlich, dass der Selektivitätsfilter die engste Stelle in der Pore ausbildet, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass dort die Selektivität der Ionen bestimmt wird (Heginbotham *et al.*, 1994). Mutationen im Selektivitätsfilter können dazu führen, dass sich die Selektivität verändern kann (Heginbotham *et al.*, 1994).

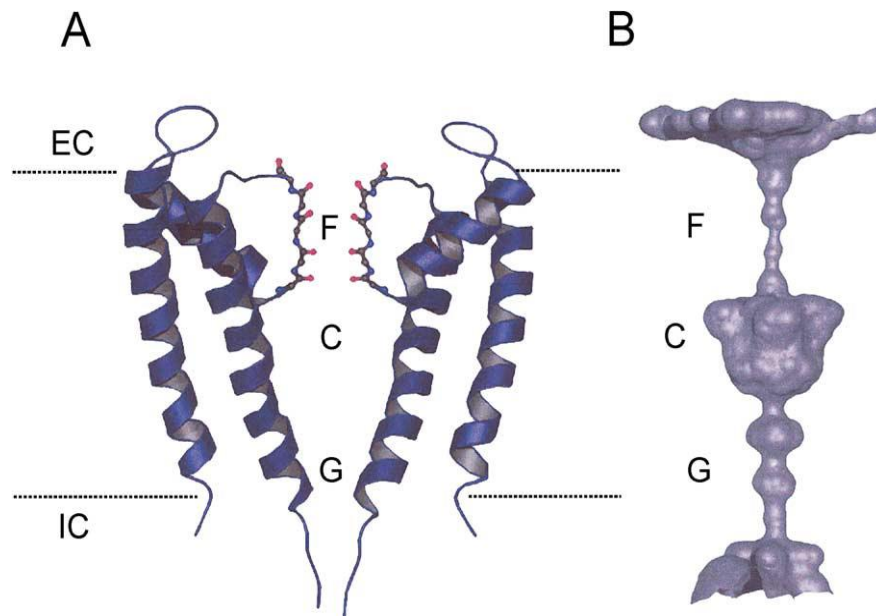


Abbildung 1.3: Struktur des K⁺-Kanals KcsA. In A sind zwei der vier Untereinheiten des KcsA dargestellt. Die Helices sind in *ribbons* und das Grundgerüst des Selektivitätsfilters in *ball-and-stick* Format gezeigt. Der Bilayer wird durch horizontale gepunktete Striche verdeutlicht (IC=intrazellulär; EC=extrazellulär). In B ist die wassergefüllte Pore dargestellt, welche aus der Filterregion (F), der *Cavity* (C) und dem *Gate* (G) besteht (Sansom *et al.*, 2002).

1.1.2. Leitfähigkeit und Selektivität der K⁺-Kanäle

Der Mechanismus für die hohe Selektivität und Leitfähigkeit der K⁺-Kanäle für K⁺ wurde vor allem an KcsA untersucht. Normalerweise gelangt K⁺ von der intrazellulären Seite in die wassergefüllte *Cavity* und passiert dann die Bindestellen (S4-S1) im Selektivitätsfilter, um anschließend den extrazellulären Ausgang zu erreichen (Abbildung 1.4 A). In wässriger Lösung verfügt K⁺ über eine Hydrathülle. Wegen der geometrischen Einschränkung, die der Filter darstellt, muss K⁺ beim Durchtritt durch den Selektivitätsfilter dehydriert werden (Doyle *et al.*, 1998). Die negativen Carbonyl-Sauerstoffatome der Carboxylgruppen der Aminosäuren im Selektivitätsfilter (S1-S4) bilden dabei einen Ersatz für die Hydrathülle von K⁺. Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt. K⁺ kann sich zwischen diesen Carbonyl-Sauerstoffatomen so ausrichten, dass diese die Hydrathülle um das Ion nachahmen, wodurch K⁺ ohne Hydrathülle durch den K⁺-Kanal geleitet werden kann. Die Energie für das Passieren von K⁺ durch den K⁺-Kanal wird dadurch erheblich herabgesetzt (MacKinnon, 2003). Dies erklärt, warum die Leitfähigkeit von K⁺ mit mehr als 10⁷ Ionen/s durch den K⁺-Kanal annähernd der Rate der freien Diffusion von Ionen in Wasser gleicht (Sansom *et al.*, 2002). Außerdem konnten MacKinnon und seine Kollegen zeigen, dass zur gleichen Zeit nur zwei K⁺ im Selektivitätsfilter vorhanden sind. Entweder sind die Ionen an der S2 und S4 Bindestelle,

oder an der S1 und S3 Bindestelle und dazwischen befinden sich Wassermoleküle (Abbildung 1.4 B und C) (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2004; Kuang *et al.*, 2015).

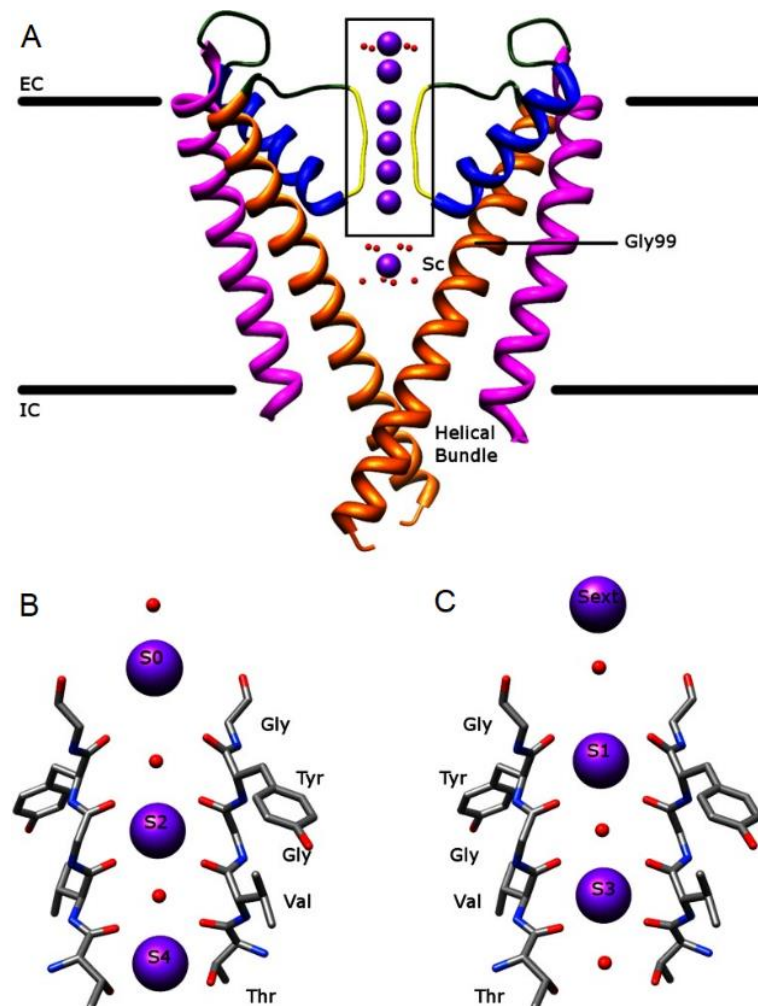


Abbildung 1.4: Selektivitätsfilter des KcsA. A zeigt zwei der vier Untereinheiten des geöffneten KcsA in einer Membran (EC=extrazellulär; IC= intrazellulär). KcsA besteht aus der TM2 (magenta), der TM1 (orange), der Porenregion (grün), der Poren-Helix (blau) und dem Selektivitätsfilter (gelb). Die K^+ -Ionen sind als violette und die Wassermoleküle als rote Moleküle dargestellt. B und C zeigen die Vergrößerung aus A (schwarze Box) in den unterschiedlichen Besetzungen des Selektivitätsfilters durch K^+ (Kuang *et al.*, 2015).

Wie bereits beschrieben, bestimmt der Abstand der Carbonyl-Sauerstoffatome der Aminosäuren im Selektivitätsfilter zueinander, welche die Hydrathülle nachahmen, die hohe Selektivität der K^+ -Kanäle für K^+ . Na^+ ist mit 0,95 Å zwar kleiner als K^+ mit 1,33 Å, kann aber im Selektivitätsfilter von den Carbonyl-Sauerstoffatomen der Aminosäuren nicht im gleichen Maße stabilisiert werden wie K^+ . Daher ist es für das dehydrierte Na^+ energetisch wesentlich ungünstiger durch den Selektivitätsfilter zu diffundieren als für K^+ (Abbildung 1.5).

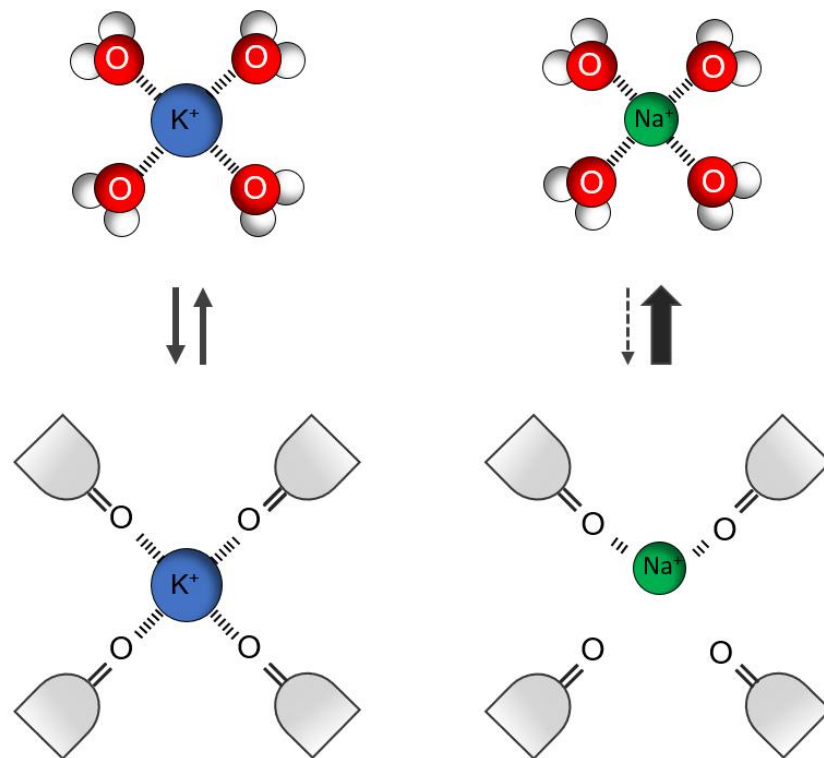


Abbildung 1.5: Selektivität des K⁺-Kanals. Aufsicht auf den Selektivitätsfilter eines K⁺-Kanals (unten) und die Hydrathülle (oben) mit dem jeweiligen Ion. Im Selektivitätsfilter ist eine Interaktion der Carbonyl-Sauerstoffatome der Aminosäuren im Selektivitätsfilter mit K⁺ möglich. Hierdurch wird die Hydrathülle von K⁺ nachgeahmt (links). Aufgrund der geringeren Größe von Na⁺ können diese nicht genügend stabilisiert werden (rechts) (verändert nach Roux, 2017).

Gating

K⁺-Kanäle können in drei verschiedenen Zuständen vorliegen: dem inaktiven, dem offenen und dem geschlossenen. Gewöhnlich liegt der K⁺-Kanal im ruhenden und somit im geschlossenen Zustand vor. Nach einem Stimulus oder auch spontan öffnet er, um anschließend wieder in den ruhenden Zustand zurück zu kehren (Kuang *et al.*, 2015). Dieser Prozess des stochastischen Öffnens und Schließens wird als *Gating* bezeichnet und kontrolliert den Durchfluss der Ionen durch den Kanal (Hille, 2001). Die Struktur, die direkt an diesem Prozess beteiligt ist, wird als *Gate* bezeichnet. Über die Lage des *Gates* gibt es bisher zwei Hypothesen: Ein funktionelles *Gate* auf der zytosolischen Seite der zweiten TM (inneres *Gate*) und ein zweites im Selektivitätsfilter, welches auch als Filtergate oder äußeres *Gate* bezeichnet wird (Kuang *et al.*, 2015).

Das innere Gate

Der geschlossene Zustand eines K^+ -Kanals, der durch das innere Gate bestimmt wird, kann anhand des KcsA beschrieben werden. Die zweiten TMs der vier Untereinheiten kreuzen sich im Bereich der intrazellulären Membrangrenzfläche (Abbildung 1.6) (Swartz, 2004; Kuang *et al.*, 2015). Diese hydrophobe Barriere verhindert den Aus- und Einstrom von Ionen. Der offene Zustand des inneren Gates in einem K^+ -Kanal wurde am MthK, einem *calcium-gated* K^+ -Kanal aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, beobachtet. Die Kristallstruktur des Kanals wurde in Anwesenheit von Ca^{2+} ermittelt, um den Kanal in den offenen Zustand zu bringen. Hier ist zu erkennen, dass die inneren Helices im MthK, an einem Glycin, nach außen abknicken (Abbildung 1.6 B und D) (Swartz, 2004). Dadurch wird die hydrophobe Barriere aufgehoben, sodass der Permeationsweg für K^+ frei ist. Dieser Mechanismus, der ein Glycin-Scharnier für den Gatingvorgang verwendet, scheint von allgemeiner Bedeutung in K^+ -Kanälen zu sein; Auch andere K^+ -Kanäle, so z.B. der spannungsabhängige K^+ -Kanal KvAP aus *Aeropyrum pernix*, weisen ein Glycin-Scharnier an ähnlicher Stelle auf (Jiang *et al.*, 2003).

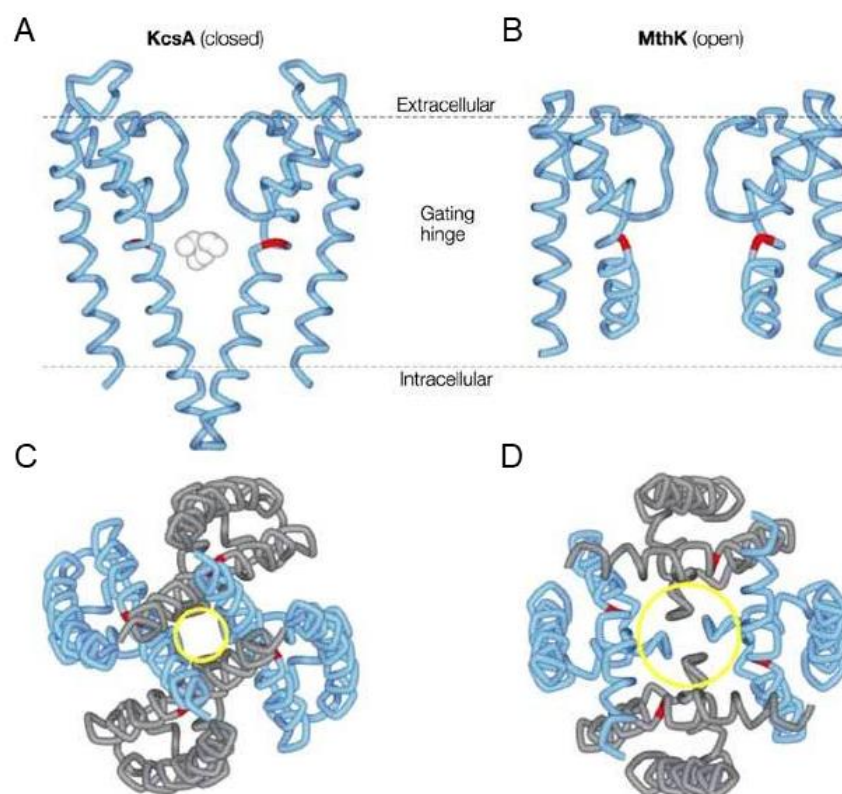


Abbildung 1.6: X-ray Struktur der K^+ -Kanäle KcsA und MthK. A und B stellen die Seitenansichten von zwei der vier Untereinheiten der beiden K^+ -Kanäle KcsA (geschlossen) und MthK (offen) dar. In rot ist das Glycin gekennzeichnet. C und D zeigen das jeweilige Tetramer der K^+ -Kanäle von der intrazellulären Seite. In gelb wird der unterschiedliche intrazelluläre Eingang dargestellt (Swartz, 2004).

Das äußere Gate

Ein zweites *Gate* liegt zur extrazellulären Seite hin im Selektivitätsfilter. Der Selektivitätsfilter nimmt verschiedene Strukturen im geschlossenen, aktiven und inaktiven Zustand an. Für den inaktiven Zustand der K^+ -Kanäle gibt es zwei verschiedene Arten: N-Typ- und C-Typ-Inaktivierung (Kuang *et al.*, 2015).

Die N-Typ-Inaktivierung existiert in einigen spannungsabhängigen K^+ -Kanälen. So zeigt der Shaker Kanal einen aktiven und einen inaktiven Zustand, zwischen denen der Kanal schnell alterniert. Bei positiven Membranspannungen wechselt er dann vermehrt in den inaktiven Zustand. Ein Modell der N-Typ-Inaktivierung ist am Beispiel des Kv1.4 in Abbildung 1.7 dargestellt (Fan *et al.*, 2012). Der N-Terminus bildet eine zytoplasmatische Domäne (*inactivation ball*) aus, welche mit dem geöffneten K^+ -Kanal interagiert und die Inaktivierung verursacht (Hoshi *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 2001). Diese besteht aus ungefähr zehn hydrophoben Aminosäuren-Resten, gefolgt von zehn hydrophilen Aminosäure-Resten mit einer positiven Ladung und befindet sich am N-Terminus auf der intrazellulären Seite (Zhou *et al.*, 2001; Kurata und Fedida, 2006). Der *inactivation ball* blockiert den geöffneten K^+ -Kanal, in dem er sich in die zentrale *cavity* setzt (Kuang *et al.*, 2015).

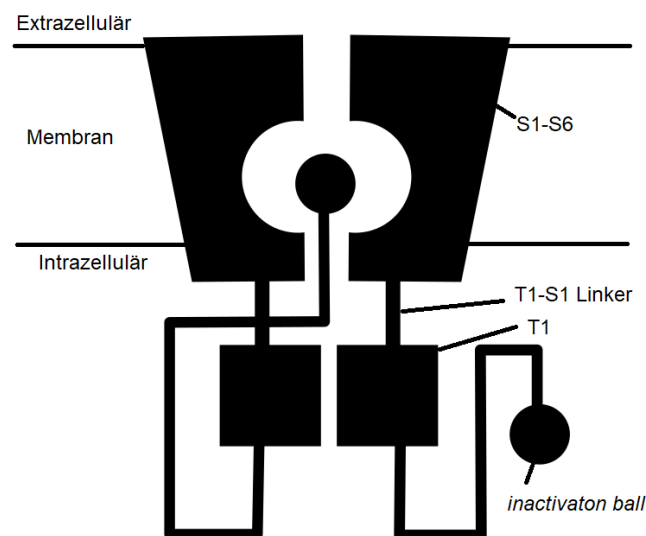


Abbildung 1.7: Modell der N-Typ-Inaktivierung an Kv1.4. Die sechs TMs sind innerhalb der Membran mit S1-S6 gekennzeichnet und T1 stellt die *Tetramerisierungs* Domäne dar. Der *inactivation ball* ist als Kugel und der T1-S1-Linker als Balken dargestellt. Der *inactivation ball* inaktiviert den K^+ -Kanal durch Interaktion mit der Pore (verändert nach Fan *et al.*, 2012).

Die C-Typ-Inaktivierung ist gewöhnlich ein langsamer Prozess (Millisekunde bis Sekunde) und resultiert aus der Konformationsänderung des Selektivitätsfilters zusammen mit der Elimination von K^+ und Wassermolekülen (Cuello *et al.*, 2010; Kuang *et al.*, 2015). Dieser Zustand konnte bei niedriger K^+ -Konzentration beobachtet werden (Yellen, 2002). Hier ähnelt der Selektivitätsfilter der Struktur eines offenen nichtleitenden Selektivitätsfilters, obwohl das intrazelluläre *Gate* geöffnet ist (Cuello *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Reorientierung des Filter-Rückgrats zum Verlust der S2 und S3 Bindestelle führt, wodurch die Leitfähigkeit der Ionen durch den Selektivitätsfilter nicht mehr gewährleistet ist (Abbildung 1.8) (Cuello *et al.*, 2010).

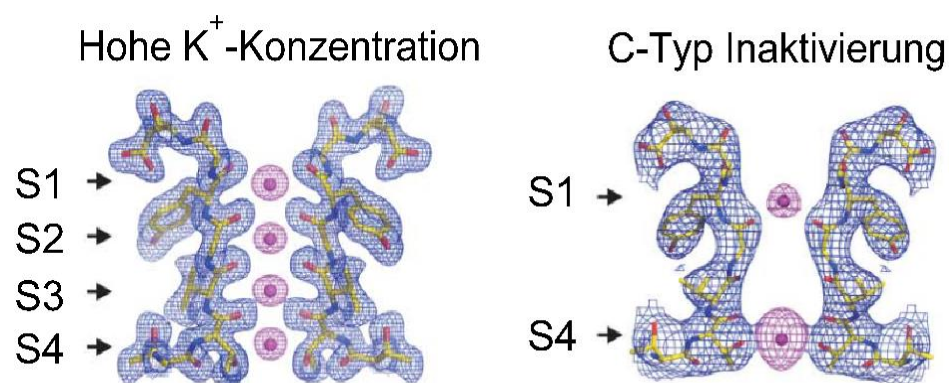


Abbildung 1.8: Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung am geöffneten-inaktiven KcsA. Links ist der geschlossene Zustand des Selektivitätsfilters des KcsA dargestellt. Rechts ist der offene inaktive Zustand gezeigt. Die Ionen sind in lila angedeutet (verändert nach Cuello *et al.*, 2010).

Spannungsabhängige K^+ -Kanäle

Es gibt spannungsabhängige K^+ -Kanäle (Kv-Kanäle) welche bei Depolarisation der Membran öffnen und bei Hyperpolarisation innerhalb von Millisekunden schließen (Yellen, 2002; Kuang *et al.*, 2015). Diese Kv-Kanäle bestehen pro Untereinheit aus sechs TMs: Die ersten vier TMs (S1-S4) bilden die Spannungs-Sensor-Domäne (*voltage sensor domain* VSD) und die letzten zwei TMs (S5-S6) bilden die Poren-Domäne aus. Die letzten zwei TMs entsprechen der ersten und zweiten TM in KcsA (Jiang *et al.*, 2003; Long *et al.*; 2005; Long *et al.*, 2007). In Abbildung 1.9 A ist eine schematische Untereinheit eines Kv-Kanals in einer Membran dargestellt.

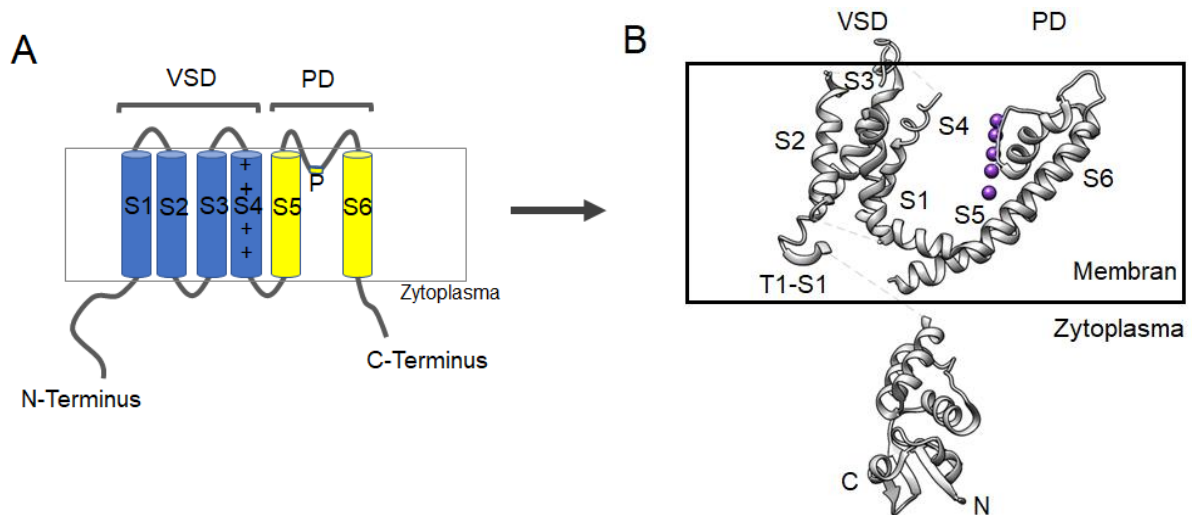


Abbildung 1.9: Struktur der Kv-Kanäle. A zeigt die schematische Darstellung einer Untereinheit der Kv-Kanäle in einer Membran (Rechteck). Die TMs sind mit S1-S6 gekennzeichnet; S1-S4 (Spannungs-Sensor-Domäne (VSD), blau), S5-S6 (Porendomäne (PD), gelb) und die Pore (P). Die positiv geladenen Aminosäuren in S4 sind mit + dargestellt. C- und N-Terminus sind entsprechend gekennzeichnet. B stellt die Kristallstruktur einer Untereinheit des Kv1.2 (PDB: 3LNM, Tao *et al.*, 2010) dar. Gekennzeichnet sind die S1-S6 Segmente, die zytoplasmatische Domäne, Linker zwischen TM1 und T1 (T1-S1) und der C- und N-Terminus. K⁺ sind mit lila Kugeln angedeutet (verändert nach Grizel *et al.*, 2014).

Die spannungsabhängige Domäne registriert das Membranpotential, was zur Konformationsänderung führt. Die elektrische Sensitivität resultiert aus den positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin) in der vierten TM. Bis zu acht positiv geladenen Aminosäuren befinden sich in jeder vierten TM in Kv-Kanälen (Kuo *et al.*, 2005). Der Shaker-Kanal besitzt sieben positiv geladene Aminosäure-Reste, welche man als R1-R4, K5, R6 und K7 bezeichnet, wobei R1-R4 den größten Anteil an der Spannungssensierung ausmachen (Aggarwal *et al.*, 1996; Swartz, 2008). Die positiv geladenen Aminosäure-Reste sind durch die hydrophoben Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure getrennt (Kuo *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass sie für die Bewegung der vierten TM durch elektrostatische Interaktionen verantwortlich sind (Kuang *et al.*, 2015).

Einwärtsgleichrichtende K⁺-Kanäle

Es gibt K⁺-Kanäle, welche mehr K⁺-Ionen, bei Spannungen die negativer als das Gleichgewichtspotential für K⁺-Ionen sind, über die Zellmembran leiten, als bei positiveren Spannungen, selbst wenn auf beiden Seiten der Membran die gleiche K⁺-Konzentration vorliegt. Diese K⁺-Kanäle bezeichnet man als Einwärtsgleichrichter, weil sie als eine Art Bio-Diode fungieren (Lu, 2004). Einwärtsgleichrichter wurden in der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts das erste Mal in Skelettmuskeln identifiziert (Katz, 1949). Sie folgen nicht der Hodgkin-Huxley Kinetik, welche besagt, dass die Leitfähigkeit von dem elektrochemischen Potential von K⁺-Ionen und der externen K⁺-Konzentration abhängig ist (Hagiwara und Takahashi, 1974).

Einwärtsgleichrichter sind für viele physiologische Prozesse wichtig. So kontrollieren sie z.B. das Ruhepotential, regulieren den Rhythmus des Herzschlages, die neuronale Aktivität und die Insulinsekretion.

Folgende Modelle beschrieben zunächst die Mechanismen der Einwärtsgleichrichtung der sogenannten *Kalium Inward rectifier* -Kanäle (Kir-Kanäle):

- (a) Der Kanal ist ein Einwärtsgleichrichter aufgrund seines asymmetrischen Profils der Energiebarriere in der geöffneten Pore (Woodbury, 1971).
- (b) Die Einwärtsgleichrichtung wird durch die Spannung gesteuert und der Kanal schließt bei Depolarisation (Ciani *et al.*, 1978; Gunning, 1983; Kurachi, 1985).

Die oben genannten Modelle konnten widerlegt werden und es konnte herausgefunden werden, dass für die Einwärtsgleichrichtung ein intrazellulärer Block verantwortlich ist. Dies konnte in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Kir-Kanäle eine ohmsche Leitfähigkeit aufweisen und nur die Anwesenheit von intrazellulären zweiwertigen Kationen, wie z.B. Magnesium (Mg²⁺), zu einem spannungsabhängigen Block führen, wodurch der Ausstrom blockiert wird (Matsuda *et al.*, 1987, Vandenberg, 1987). Neben Mg²⁺ sind auch intrazelluläre Polyamine, wie z.B. Spermidin, in der Lage Kir-Kanäle zu blockieren, um so eine Einwärtsgleichrichtung zu generieren (Lopatin *et al.*, 1995).

Die strukturellen Details von Kir-Kanälen hinsichtlich ihrer Blockierung durch Mg²⁺ und Polyamine sind inzwischen gut untersucht. Die erste identifizierte Bindestelle für Mg²⁺ in Kir2.1 wurde in der zweiten TM an Stelle 172 identifiziert. Eine Mutation der Aminosäure Asparaginsäure zu Asparagin zeigt einen reduzierten Block durch Polyamine oder Mg²⁺ (Lu und MacKinnon, 1994). Als zweite Bindestelle für Polyamine konnte die Stelle E224 ausfindig

gemacht werden, welche nach der zweiten TM im C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne liegt (Tagliatela *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stelle E299 als weitere Bindestelle für Spermin eine Rolle spielt (Kubo und Murata, 2001). 2002 konnte durch Kubo Y. und Fujiwara Y. eine weitere Bindestelle für Mg^{2+} gefunden werden. Diese Stelle 165 liegt noch tiefer in der Pore als 172. Allerdings ist diese Stelle nur für Mg^{2+} , nicht aber Spermin, zugänglich (Fujiwara und Kubo, 2002). In Abbildung 1.10 ist die Porenstruktur des Kir2.1 mit seinen oben genannten Bindestellen für Spermin und Mg^{2+} dargestellt (Fujiwara und Kubo, 2002).

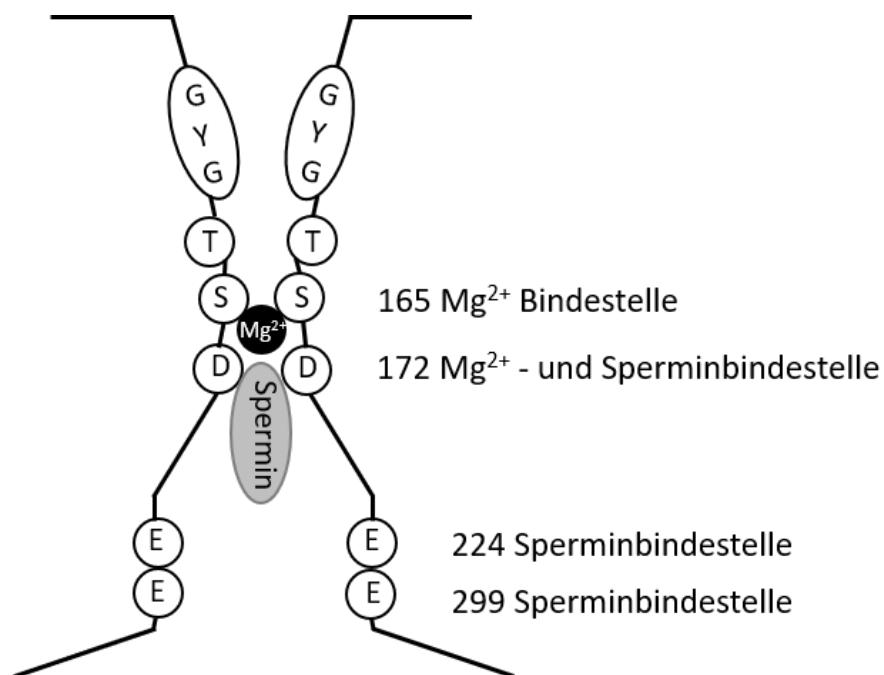


Abbildung 1.10: Modell der Porenstruktur in Kir2.1. Die schematische Pore zeigt die entsprechenden Bindestellen für Spermin und Mg^{2+} (verändert nach Fujiwara und Kubo, 2002).

1.2. Virale K⁺-Kanäle

K⁺-Kanäle kommen in allen Lebensformen vor (Hille, 2001). So besitzen auch Viren kodierende Sequenzen für K⁺-Kanäle, welche alle Merkmale von funktionellen K⁺-Kanälen aufweisen (Fischer und Sansom, 2002; Wang *et al.*, 2011; Nivea *et al.*, 2012). Je nach Virus sind die K⁺-Kanäle bei der Infektion oder bei der frühen Phase der Infektion, bei der Replikation oder beim Austritt des Virus aus den Wirtszellen beteiligt (Thiel *et al.*, 2010). Der erste bekannte und untersuchte K⁺-Kanal wurde aus dem Virus *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* (PBCV-1) isoliert (Plugge *et al.*, 2000). Zu dieser Zeit war Kcv_{PBCV-1} der kleinste bekannte und primitivste K⁺-Kanal, welcher aus nur 94 Aminosäuren pro Untereinheit besteht (Plugge *et al.*, 2000). Hydrophobizitäts-Analysen des viralen K⁺-Kanals Kcv_{PBCV-1} sagen zwei putative TMs voraus, welche durch 44 Aminosäuren getrennt sind und die typische Signatursequenz TXXTXGY/FG aller bisher bekannter K⁺-Kanäle beinhaltet (Plugge *et al.*, 2000; Tayefeh *et al.*, 2009). Kcv_{PBCV-1} besitzt allerdings einen nur sehr kleinen zytoplasmatischen N-Terminus, hingegen ist der C-Terminus Teil der zweiten TM. Phylogenetisch betrachtet, gehört Kcv_{PBCV-1} zu einem unabhängigen Cluster von Virus kodierten K⁺-Kanälen und nicht zu den typischen K⁺-Kanälen, wie die Kv und die Kir-Kanäle (Plugge *et al.*, 2000). Trotz der geringen Größe weist Kcv_{PBCV-1} viele funktionelle Eigenschaften eines komplexen K⁺-Kanals auf. So zeigt Kcv_{PBCV-1} nach heterologer Expression eine selektive K⁺-Leitfähigkeit mit einer mäßigen Spannungsabhängigkeit. Außerdem lässt er sich durch K⁺-Kanalblocker blockieren; ferner kann die Aktivität durch intra- und extrazelluläre Faktoren modifiziert werden (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarrini *et al.*, 2003).

Neben Kcv_{PBCV-1} wurden inzwischen viele weitere virale K⁺-Kanäle gefunden und elektrophysiologisch untersucht. Wegen der geringen Größe der Kanalproteine und ihrer robusten Funktion konnten mit diesen Kanälen basale Funktionsmechanismen in K⁺-Kanälen aufgeklärt werden. So konnte z.B. der *Gating* Mechanismus der Kcv Kanäle Smith (S) und Next-to-Smith (NTS) durch ein Zusammenspiel von wenigen AS erklärt werden. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Kcv Kanäle, zeigt Kcv_{NTS} mit 90% eine höhere Offenwahrscheinlichkeit als Kcv_S mit 40%. Dies ist auf eine intrahelikale Wasserstoffbrückenbindung des Serins in der zweiten TM des Kcv_S zurückzuführen. Durch den daraus resultierenden Knick ist es möglich, dass der aromatische Ring der nachfolgenden Aminosäure Phenylalanin in die *Cavity* des K⁺-Kanals schwingt und so den Ionenfluss blockiert (Rauh *et al.*, 2017).

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die minimale Größe und funktionelle Robustheit der viralen K^+ -Kanäle ein ideales Modellsystem darstellt, um Struktur-Funktionszusammenhänge in K^+ -Kanalporen zu verstehen. Sie sind auf die funktionelle Einheit eines K^+ -Kanals beschränkt und weisen trotzdem alle Merkmale komplexer K^+ -Kanäle, welche aus bis zu 1000 Aminosäuren bestehen, auf. In Abbildung 1.11 ist zum Vergleich der K^+ -Kanal Kir3.1, als Vertreter der komplexen K^+ -Kanäle und Kmpv_{SP1}, als Beispiel für einen minimalen viralen K^+ -Kanal, dargestellt. Hier wird nochmals der Größenunterschied deutlich.

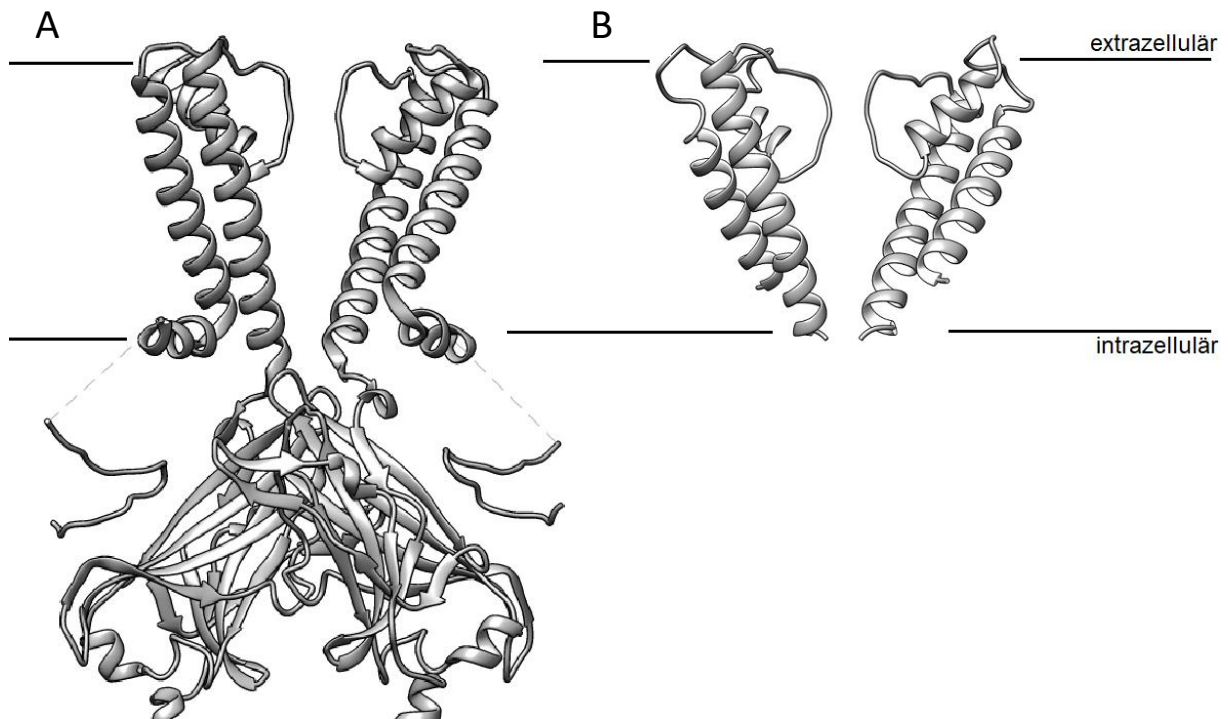


Abbildung 1.11: Vergleich des K^+ -Kanals Kir3.1 und des viralen K^+ -Kanals Kmpv_{SP1}. In A ist der Kir3.1 (PDB: 2QKS Nishida *et al.*, 2007) und in B das Homologiemodell von Kmpv_{SP1} abgebildet. Es sind jeweils zwei der vier Untereinheiten dargestellt. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt.

1.2.1. Kmpv-Kanäle

Neben den viralen Kcv Kanälen aus Süßwasserviren gibt es weitere Viren, welche in ihrem Genom codierende Sequenzen für K⁺-Kanäle aufweisen. So konnten auch aus Viren aus dem Ozean, welche die Grünalge *Micromonas pusilla* befallen, K⁺-Kanäle (Kmpv, K⁺ *Micromonas pusilla* Virus) isoliert werden. Diese Viren gehören, wie Kcv_{PBCV-1}, zur Familie der Phycodnaviren (Feng und Curtis, 1996; Siotto *et al.*, 2014). Der bisher kleinste funktionelle virale K⁺-Kanal gehört zu den Kmpv-Kanälen. Dieser besteht aus lediglich 78 Aminosäuren und stammt aus dem *Micromonas pusilla* Virus Isolat 12T (Kmpv_{12T}). Ein weiterer K⁺-Kanal aus dem *Micromonas pusilla* Virus 1 (Kmpv₁) besitzt lediglich eine Aminosäure mehr. Auch Kmpv_{SP1}, aus dem *Micromonas pusilla* Virus Isolat SP1, ist mit 86 und Kmpv_{PL1}, aus dem *Micromonas pusilla* Virus Isolat PL1, mit 85 Aminosäuren pro Untereinheit ein minimal aufgebauter K⁺-Kanal (Siotto *et al.*, 2014; Siotto, 2017). Beide Proteine weisen trotz der geringen Größe alle typischen Merkmale bisher bekannter K⁺-Kanäle auf.

Algorithmen zur Vorhersage von TMs haben gezeigt, dass nicht alle Aminosäure-Sequenzen der viralen K⁺-Kanäle aus *Micromonas pusilla* (Kmpv) (Siotto *et al.*, 2014) die typische Struktur der komplexen K⁺-Kanäle mit zwei TMs und der Porenregion aufweisen (Doyle *et al.*, 1998). So sagen die Strukturvorhersagen für Kmpv_{12T} und Kmpv₁ keine zweite TM voraus (Siotto *et al.*, 2014). Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl Kmpv_{SP1}, Kmpv_{12T} als auch Kmpv₁ funktionelle K⁺-Kanäle bilden und eine selektive K⁺-Leitfähigkeit generieren (Siotto *et al.*, 2014; Siotto, 2017). Da in den betreffenden Kanälen jedoch die konservierte α -helikale Struktur, die der TM zugrunde liegt, vorhanden ist, wird angenommen, dass die Aminosäure Komposition der viralen Kanäle nicht der von eu- und prokaryotischen Membranproteinen entspricht und daher von den Strukturanalyseprogrammen nicht als TMs erkannt werden (Siotto, 2017). Obwohl Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} eine hohe Übereinstimmung in ihren Aminosäure-Sequenzen besitzen, zeigen sie ein völlig unterschiedliches elektrophysiologisches Verhalten: Kmpv₁ zeigt eine ohmsche K⁺-Leitfähigkeit und Kmpv_{SP1} ist ein Einwärtsgleichrichter. Außerdem ist Kmpv_{SP1} wesentlich sensibler für die typischen K⁺-Kanalblocker Barium (Ba²⁺) als Kmpv₁ (Siotto *et al.*, 2014; Siotto, 2017).

1.3. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss darüber geben, warum zwei sehr ähnliche virale K^+ -Kanäle sich in ihrer Spannungsabhängigkeit so sehr unterscheiden, dass einer eine ohmsche Leitfähigkeit und der andere einen Gleichrichter generiert.

Dazu wurde zunächst überprüft, ob es sich bei der Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} um eine intrinsische Eigenschaft handelt, oder ob die Einwärtsgleichrichtung, wie bei den Kir-Kanälen, auf einen intrazellulären Block zurückzuführen ist (Hibino *et al.*, 2010). Hierfür wurde Kmpv_{SP1} in einen planaren Lipid-Bilayer rekonstituiert, um alle Moleküle, die eine Blockierung bewirken können, zu eliminieren.

Außerdem wurde der Einfluss der typischen K^+ -Kanalblocker Cs^+ und Ba^{2+} auf Kmpv_{SP1} und die Leitfähigkeit für Rb^+ und Na^+ untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die strukturellen Unterschiede zwischen den zwei Kanälen weiter ausgenutzt, um die molekulare Ursache für die intrinsische Gleichrichtung des Kmpv_{SP1} Kanals zu verstehen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten wurde der Kmpv₁ Kanal mit seiner ohmschen Leitfähigkeit als Referenzkanal verwendet. Der Kmpv_{SP1} Kanal wurde dann gezielt verändert, um mittels Punktmutationen oder durch Austausch ganzer Domänen die Ähnlichkeit zu Kmpv₁ zu erhöhen. In Kombination mit funktionellen Messungen sollten dadurch die Strukturen, welche für die Einwärtsgleichrichtung des K^+ -Kanals Kmpv_{SP1} verantwortlich sind, identifiziert werden. Aus vorherigen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die Gleichrichtungseigenschaften von Kmpv_{SP1} nicht an die besonderen Poreneigenschaften dieses Kanals gekoppelt sind. Denn eine Chimäre, bestehend aus den TMs von Kmpv_{SP1} und der Porenregion von Kmpv₁ (TM1+2 Kmpv_{SP1}/Kmpv₁ Loop), zeigt weiterhin eine Einwärtsgleichrichtung (Siotto, 2017).

Neben der unterschiedlichen K^+ -Leitfähigkeiten sind Kmpv₁ als auch Kmpv_{SP1} sensitiv für die typischen K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} , wobei Kmpv_{SP1} jedoch wesentlich sensitiver ist als Kmpv₁ (Siotto, 2017). In dieser Arbeit soll untersucht werden, durch welche Struktur sich die unterschiedliche Ba^{2+} -Sensitivität begründen lässt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, über die Firmen Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot) und Carl-Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.2. Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten

Die Sterilisation von Glasmaterial wurde für acht Stunden bei 160°C im Trockenschrank durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden für 20 Minuten bei 121°C feuchter Hitze und einem Druck von 1,5 bar autoklaviert oder mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

2.3. Mutagenese

Zur Erstellung der Mutanten der Kanalproteine wurde zum einen die ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oder die Chimären-PCR verwendet. Die verwendeten Primer wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) synthetisiert. Die Sequenzen der Primer befinden sich im Anhang (9.2).

Für die SDM-PCR wurde die *QuickChange™*-Methode verwendet (Papworth *et al.*, 1996), um einzelne Punktmutationen oder Substitutionen von bis zu zwölf Aminosäuren zu erstellen. Unter Verwendung zweier revers-komplementärer Primer wurde durch Amplifikation des gesamten Plasmids die gewünschte Mutation eingefügt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%-Agarose-Gel in 1-fach TAE (40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA) aufgetrennt und anschließend mit dem Zymoclean™ *Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, Irvine, CA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um die *template*-DNA zu entfernen, wurde ein Restriktionsverdau mit *FastDigest* DpnI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Von dem Verdau wurden 5 µL in hitzekompetente *E. coli*-DH5α Zellen (Stratagene, Heidelberg) durch Hitzeschocktransformation, bei 45°C für 45 Sekunden, 2 Minuten auf Eis und anschließender Zugabe von 250 µL SOC-Medium (20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM

KCl, 100 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,5 eingestellt mit 1 M NaOH), transformiert. Der Ansatz wurde auf LB-Agar-Platten (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 20 g/L Agar, pH 7 eingestellt mit 1 M NaOH) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die LB-Agar Platten enthielten, je nach verwendetem Vektor, Kanamycin (Kana) (20 g/L) (pEGFP-N2) oder Ampicillin (Amp) (20 g/L) (pEXP5-CT/TOPO). Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und in 5 mL LB-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7 eingestellt mit 1 M NaOH) für eine weitere Nacht inkubiert. Das LB-Medium enthielt wieder Kana (50 mg/L) oder Amp (50 mg/L). Danach wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep™-Classic-Kit (Zymo Research) aufgereinigt und die DNA-Konzentration mit Hilfe des *Nano-Drop*® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) photometrisch bestimmt. Die Sequenzen wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg) sequenziert und die Ergebnisse der Sequenzierung mit NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) oder *SnapGene* (GSL Biotech; Chicago, IL, USA) ausgewertet.

Zur Herstellung der Chimären aus Kmpv_{SP1} und Kmpv₁, bei denen mehrere hintereinander liegende Aminosäuren ausgetauscht wurden, wurde die Chimären-PCR verwendet. Hierfür wurden die gewünschten Genfragmente aus der jeweiligen *template*-DNA, hier Kmpv₁ und Kmpv_{SP1}, amplifiziert. Durch das Einbringen eines Überhangs mittels Primer, der komplementär zu dem benachbarten Genfragment ist, konnte eine Fusion der Genfragmente in der dritten PCR ermöglicht werden. Für die PCR-Ansätze wurde die *Phusion*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific (Rockford, (IL), USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch, wie oben beschrieben, aufgetrennt und anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) isoliert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des *Nano-Drop*® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit den *FastDigest* Enzymen XhoI und EcoRI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), nach Herstellerangaben, wurde eine Ligation mit der T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) in den Vektor pEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Der Vektor pEGFP-N2 wurde zunächst auch mit den *FastDigest* Enzymen XhoI und EcoRI, nach Herstellerangaben, verdaut, damit sich die gewünschte Plasmid-DNA und der Vektor an entsprechender Stelle verknüpfen können. Der Ligationsansatz setzt sich aus 50 ng verdautem pEGFP-N2, 20 ng verdauter Plasmid-DNA, 2 µL Puffer und 1 µL T4-Ligase zusammen, mit ddH₂O wurde dieser auf 20 µL aufgefüllt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C für 10 min hitzeinaktiviert. Der gesamte Ligationsansatz wurde in hitzekompetente *E. coli* DH5α-Zellen, wie oben beschrieben, transformiert und auf LB-Kana/Amp-Agar-Platten ausplattiert. Die Kolonien der über Nacht kultivierten

LB-Kana/Amp-Agar-Platten wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR auf das gewünschte Insert überprüft. Hierfür wurde jeweils eine Kolonie gepickt und in 10 μ L ddH₂O gelöst. Davon wurden 2 μ L für die Kolonie-PCR, welche mit der *Phusion*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific (Rockford, (IL), USA) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass der *forward* Primer im Vektor und der *reverse* Primer am Ende des gewünschten Inserts bindet. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%-Agarose-Gel in 1-fach TAE (40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Die positiven Kolonien wurden in LB-Kana/Amp-Flüssigmedium angeimpft und am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep™-Classic-Kit (Zymo Research) isoliert und ihre DNA-Konzentration mit Hilfe *Nano-Drop*® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen) photometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg). Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) oder *SnapGene* (GSL Biotech; Chicago, IL, USA) ausgewertet.

2.4. Zellkultur

Als heterologes Expressionssystem wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung der viralen K⁺-Kanäle HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) verwendet. Die Zelllinie wurde durch Einbringen von Adenovirus-DNA in embryonale, humane Nierenzellen hergestellt (Graham *et al.*, 1977). Sie eignen sich aufgrund ihrer geringen Anzahl endogener Kanäle sehr gut als Expressionssystem, um heterologe Kanalproteine zu analysieren. Die HEK293-Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 4-5% CO₂ in DMEM/F-12 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kultiviert.

Zur Expression der Kanalproteine wurden die HEK293-Zellen mit der Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz GeneJuice® (Novagen, EMD Millipore Corp. Billerica, MA USA) nach Herstellerangaben transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 4-5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die HEK293-Zellen vereinzelt. Hierfür wurden sie zunächst mit 700 μ L *Phosphate buffered saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Aldrich GmbH, Taufkirchen) gewaschen und mit 400 μ L Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), einem proteolytischen Enzym mit Collagenase-Aktivität, vom Boden abgelöst. Daraufhin wurde die Reaktion mit 2 mL Medium abgestoppt und die Zellsuspension wurde auf

neue Petrischalen aufgeteilt, sodass die HEK293-Zellen einzeln vorliegen. Nach der Vereinzelung wurden sie für weitere 1-2 Stunden inkubiert und danach mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen.

2.5. Patch-Clamp Technik

In dieser Arbeit wurden die Kanalproteine unter anderem mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik untersucht. Bereits 1976 wurde diese Technik durch Neher und Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann, 1976). Die *Patch-Clamp* Technik ermöglicht es den Strom bei unterschiedlich angelegten Spannungen über die Membran zu messen. Hierfür wurde das Kanalprotein von Interesse als Fusionsprotein mit EGFP am C-Terminus in HEK293-Zellen exprimiert. Die elektrischen Messungen wurden bei Raumtemperatur (ca. 25°C) durchgeführt. Die Ströme wurden mit einem EPC-9 *Patch-Clamp* Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit Patchmaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) analysiert. Um die makroskopischen Ströme zu ermitteln, wurde ein Standard-Pulsprotokoll angelegt. Die Zellen wurden dazu von einer Anfangshaltespannung von 0 mV (200 ms) in Spannungssprüngen auf Testspannungen von -120 mV bis 80 mV in 20 mV Schritten für jeweils 1000 ms gebracht, anschließend wurden sie wieder auf eine Haltespannung von -80 mV für 200 ms geklemmt. Chlorierter Silberdraht wurde als Erd- und Pipettenelektrode verwendet. Die Messpipette wurden aus Borosilikatglas (*Tube, Capillary, Melting point*, 1.5-1.8 × 100 mm, Kimble Chase, Gerresheimer, Vineland, USA) mit Hilfe des Pipettenziehgerätes (PP 830, Narshige, London, England) hergestellt. Der Pipettenwiderstand der verwendeten Pipetten betrug 3-7 MΩ. In der vorliegenden Arbeit wurde die *whole-cell* Konfiguration verwendet, bei der die Ströme über die gesamte Plasmamembran mit PatchMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen werden. Bei einer Rate von 4 kHz wurden diese aufgezeichnet. Anschließend wurden sie mit FitMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) analysiert und die Abbildungen mit Igor Pro 6 (Wavemetrics, Tigard, USA) erstellt.

Für die interne Lösung (Pipettenlösung) wurde während der gesamten Experimente 130 mM D-Gluconsäure-Kaliumsalz, 10 mM Natriumchlorid, 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 0,1 mM GTP, 0,1 μM Calciumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Phosphocreatin-Dinatriumsalz und 2 mM ATP, mit 1 M KOH auf pH 7,4, verwendet. Für die externe Lösung (Badlösung) wurde 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, mit 1 M KOH auf pH 7,4 genutzt, diese Lösung wird in dieser Arbeit als Standard-Lösung bezeichnet. Je nach Untersuchung wurde die externe K⁺-Lösung mit 1 μM bis 10 mM BaCl₂ oder 1-10 mM Cs⁺ ergänzt. Anschließend wurde die Osmolarität der Lösungen mit Mannitol auf 320 mOsmol/Kg eingestellt. Für die externe

RbCl- und NaCl-Lösung wurde KCl durch RbCl bzw. NaCl ersetzt und der pH-Wert wurde mit RbOH bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt.

Für den Austausch der externen Lösung wurde eine Perfusionskammer (Warner Instruments, Hamden USA) verwendet. Diese ermöglichte aufgrund des geringen Volumens einen schnellen Austausch der externen Lösung. Hierfür wurden die HEK293-Zellen nach dem Vereinzeln auf Coverslips ($\varnothing=15$ mm) (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sodenheim) ausgesät. Die Coverslips wurden anschließend mit einer Pinzette in die Perfusionskammer mit externer Lösung gelegt. Mit Hilfe des Junction Potential Calculator (JPCalc) wurde das *Liquid junction* Potential in den Standard-Lösungen (130 mM K^+ intern und 50 mM K^+ extern) kalkuliert (Barry, 1994). Hieraus ergibt sich ein *Liquid junction* Potential von 14 mV, welches in den folgenden *Patch-Clamp* Messungen nicht korrigiert wurde.

2.6. Lipid-Bilayer Technik

Um die Einzelkanalamplituden und die Offenwahrscheinlichkeiten einiger Kanalproteine und deren Mutanten in einem zellfreien System zu bestimmen, wurde die planare Lipid-Bilayer Technik verwendet. Zunächst wurde die gewünschte Sequenz aus pEGFP-N2 amplifiziert und in pEXP-CT/TOPO eingefügt. Um die gewünschten Gene aus pEGFP-N2 zu amplifizieren, wurde die *Taq*-Polymerase (Thermo Scientific, Rockford (IL), USA), nach Herstellerangaben, verwendet. Die *Taq*-Polymerase ist nötig, da sie am PCR-Produkt Poly-A-Schwänze anfügt, welche für die spätere Topo Klonierungsreaktion nötig sind. Die verwendeten Primer für die jeweilige Umklonierung sind im Anhang 9.2 aufgelistet. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%-Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend mit dem Zymoclean™ *Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, Irvine, CA, USA), nach Herstellerangaben, aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des *Nano-Drop*® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen) photometrisch bestimmt. Anschließend wurde unter Verwendung des pEXP5-CT/TOPO® *TA Expression Kit* (Life Technologies GmbH, Darmstadt) die gewünschte DNA, nach Herstellerangaben, in den Vektor pEXP5-CT/TOPO kloniert. Die Kolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR auf das gewünschte Insert überprüft. Hierfür wurde jeweils eine Kolonie gepickt und in 10 μ L ddH₂O gelöst. Davon wurden 2 μ L für die Kolonie-PCR, welche mit der *Phusion*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific (Rockford, (IL), USA) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass der *forward* Primer im Vektor und der *reverse* Primer am Ende des gewünschten Inserts bindet. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%-Agarose-Gel in 1-fach TAE (40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Die positiven Kolonien wurden in LB-Amp-

Flüssigmedium angeimpft und am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep™-Classic-Kit (Zymo Research) isoliert und ihre DNA-Konzentration mit Hilfe des Nano-Drop® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen) photometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg). Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) oder SnapGene (GSL Biotech; Chicago, IL, USA) ausgewertet.

Anschließend wurde die *in vitro* Expression der Kanalproteine mit dem MembraneMax HN Protein Expression Kit (Invitrogen, Karlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Aus der *template* DNA, durch Anwesenheit von *nanolipoprotein particles* (NLPs), ergibt sich eine hohe Ausbeute an löslichem Membranprotein. NLPs sind scheibenförmige Partikel mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, sie bilden ein ringförmiges Gerüstprotein aus, welches einen planaren DMPC (1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) Lipid-Bilayer umschließt (Katzen, 2008). Durch den His-Tag an den Gerüstproteinen der NLPs, ist eine Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie möglich. Für die Aufreinigung wurden die 0,2 mL HisPur™ Ni-NTA Spin-Säule (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) genutzt. Die Säulen wurden, anders als in den Herstellerangaben angegeben, dreimal mit zweifachem Bettvolumen 20 mM Imidazol gewaschen, um unspezifische Bindemittel zu entfernen. Die Kanalproteine/NLP Konjugate wurden anschließend in drei Fraktionen mit je 200 µL reinem 250 mM Imidazol eluiert. Um die Rekonstitutionseffizienz in den Lipid-Bilayern zu verbessern wurden die Wasch- und Elutionsschritte in Abwesenheit zusätzlicher Salze durchgeführt (Winterstein *et al.*, 2018).

Die planaren Lipid-Bilayer Experimente wurden mit dem vertikalen Bilayer-Setup durchgeführt (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland), hierfür wurde die Protein-Lösung aus dem ersten Elutionsschritt verwendet. Die Vorbereitung der Messkammer erfolgte nach Winterstein und Mitarbeitern (Winterstein *et al.*, 2018).

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (ca. 25°C) in einer 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) Membran (15 mg/mL) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), welches in *n*-Pentan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst wurde, durchgeführt. Die Aufspannung des Bilayers erfolgte durch die *monolayer folding* Technik (Montal & Mueller, 1972) oder die *pseudo painting/air bubble* Technik (Braun *et al.*, 2014). Als Messlösung wurde eine 100 mM KCl-Lösung verwendet, welche mit 10 mM HEPES gepuffert und der pH-Wert mit KOH auf 7,0 eingestellt wurde. Das aufgereinigte Membranprotein wurde unverdünnt zur Rekonstitution in die DPhPC-Membran in die *trans*-Kammer mit einer 25 µL Hamilton Spritze gegeben. Im Fall, dass sich zu viele Membranproteine in die Membran eingebaut hatten, wurde

die erste Elutionsfraktion in der oben genannten Messlösung verdünnt. Hierfür wurde die Messlösung verwendet, damit das Membranprotein aufgrund der gleichen Dichte der Lösung auf der Höhe der DPhPC-Membran, wo es mit der Hamilton Spritze hinzugegeben wurde, verbleibt und der Einbau eines einzelnen Kanals mit höherer Wahrscheinlichkeit erfolgen kann. Bei manchen Experimenten wurde EDTA in die Lösung hinzugegeben, um Verunreinigungen mit zweiwertigen Kationen, wie z.B. Mg^{2+} zu vermeiden. Hierfür wurde EDTA in die *trans* und *cis*-Kammer mit einer Endkonzentration von 1 mM pipettiert.

Für die Aufnahmen der Einzelkanalfluktuationen wurden Kommandospannungen von -160 mV bis +160 mV in 20 mV Schritten für 10 s oder 60 s über die Membran angelegt. Die Ströme wurden mit einem EPC-9 *Patch-Clamp* Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit PatchMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit FitMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) und KielPatch (version 3.20 ZBM/2011, CAU Kiel, Deutschland). Anschließend wurden die Abbildungen mit Igor Pro 6 (Wavemetrics, Tigard, USA) generiert.

2.7. Software

Für die Aufnahme der *whole-cell* Messungen und der Lipid-Bilayer Messungen wurde PatchMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) verwendet. Anschließend wurden die makroskopischen Ströme mit FitMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) und die Einzelkanalmessungen mit KielPatch (Version 3.20 ZBM/2011, CAU Kiel, Deutschland) oder FitMaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) analysiert und mit Excel (Microsoft, Redmond, USA) ausgewertet. Die Abbildungen wurden jeweils mit IGOR Pro 6 (Wavemetrics, Tigard, USA) erstellt.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur der Proteine wurde mit dem Jpred4-Algorithmus erstellt (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index.html>) (Drozdetskiy *et al.*, 2015).

Zur Erstellung der Homologiemodelle wurden Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2 verwendet. Bekannte Strukturmodelle wurden von der Proteindatenbank PDB (<https://www.rcsb.org/>) übernommen.

2.8. Statistik

Die dargestellten Datenpunkte entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem arithmetischen Mittel

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

oder dem geometrischen Mittel

$$\bar{y} = \left(\prod_{i=1}^n y_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Dabei sind \bar{y} der Mittelwert und y_i der i-te Wert der Datenreihe (y_1, y_2, \dots, y_n) .

Wenn die Datenpunkte als arithmetisches Mittel angegeben werden, wird die Abweichung $\Delta\bar{y}$ von diesem Mittel als arithmetische Standardabweichung berechnet:

$$\Delta\bar{y} = \pm \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Werden die Datenpunkte als geometrisches Mittel angegeben, werden die positiven und negativen Abweichungen wie folgt berechnet:

$$\Delta\bar{y}^+ = \bar{y} \cdot \sigma - \bar{y} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

$$\Delta\bar{y}^- = \bar{y} - \frac{\bar{y}}{\sigma} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

mit

$$\sigma = \exp \left(\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\ln \frac{y_i}{\bar{y}} \right)^2} \right) \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

3. Ergebnisse

Viren besitzen kodierende Sequenzen für K⁺-Kanäle. Diese weisen die gleiche Signatursequenz auf, wie alle typischen K⁺-Kanäle und besitzen alle Merkmale eines funktionellen K⁺-Kanals (Plugge *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den eukaryotischen K⁺-Kanälen bestehen die viralen K⁺-Kanäle aus einer wesentlich geringeren Anzahl an Aminosäuren und bilden mit nur zwei TMs und einem Porenloop pro Untereinheit einen funktionellen K⁺-Kanal aus. So besitzt der erste charakterisierte virale K⁺-Kanal, Kcv_{PBCV-1}, nur 94 Aminosäuren (Plugge *et al.*, 2000), während die strukturell verwandten Kir-Kanäle aus wesentlich mehr Aminosäuren aufgebaut sind. So weist z.B. der eukaryotische Kir2.1 369 Aminosäuren auf (Tao *et al.*, 2009). Aus diesem Grund eignen sich die minimalistischen viralen K⁺-Kanäle hervorragend als Modellsystem für die Untersuchung von Struktur-Funktionsanalysen von K⁺-Kanälen.

In dieser Arbeit wurde der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} untersucht. Er stammt aus dem Virus der Familie der Phycodnaviren und dieser Virus befällt die Grünalge *Micromonas pusilla* (Feng und Curtis, 1996). Kmpv_{SP1} ist, anders als alle bisher bekannten viralen K⁺-Kanäle, ein ausgeprägter Einwärtsgleichrichter. Er zeigt bei negativen Spannungen einen deutlichen K⁺-Einstrom, hingegen bei positiven Spannungen nur einen sehr geringen K⁺-Ausstrom (Siotto *et al.*, 2017). Bei Kir-Kanälen, welche auch eine Einwärtsgleichrichtung aufweisen, ist bekannt, dass die Einwärtsgleichrichtung auf einen intrazellulären Block des K⁺-Ausstroms durch divalente Kationen oder Polyamine zurückzuführen ist (Lopatin *et al.*, 1995, 1994; Matsuda *et al.*, 1987; Fakler *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei Kmpv_{SP1} auch um einen intrazellulären Block des K⁺-Ausstroms handelt und ob die Einwärtsgleichrichtung darauf zurückzuführen ist. Bei Kir-Kanälen ist außerdem bekannt, dass eine Wurzelabhängigkeit der Leitfähigkeit zur externen K⁺-Konzentration besteht (Hagiwara und Takahashi, 1974; Lopatin und Nichols, 1996; Makhina *et al.*, 1994; Perier *et al.*, 1994; Sakmann und Trube, 1984). Daher wurde untersucht, ob dies auch auf Kmpv_{SP1} zutrifft. Des Weiteren wurde Kmpv_{SP1} auf seine elektrophysiologischen Eigenschaften für die typischen K⁺-Kanalblocker Ba²⁺ und Cs⁺ und die Leitfähigkeit für Rb⁺ und Na⁺ untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit, wurde als Referenz, der virale K⁺-Kanal Kmpv₁ herangezogen und im Vergleich zu Kmpv_{SP1} untersucht. Kmpv₁ stammt aus dem *Micromonas pusilla virus 1*, welcher allerdings eine ohmsche K⁺-Leitfähigkeit zeigt (Siotto *et al.*, 2014). Aus diesem Grund eignet sich dieser Kanal als Vergleich, um strukturelle Faktoren durch Mutationsstudien zu identifizieren, welche für die unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften verantwortlich sind.

3.1. Kmpv_{SP1} - ein intrinsischer Einwärtsgleichrichter

Vorhergehende Arbeiten haben gezeigt, dass der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} eine Einwärtsgleichrichtung nach Expression in HEK293-Zellen und Rekonstitution im planaren Bilayer aufweist (Siotto, 2017). Dies kann in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Nach Expression von Kmpv_{SP1}::EGFP in HEK293-Zellen, zeigt sich eine K⁺-Leitfähigkeit (Abbildung 3.1 C und D), welche sich von der K⁺-Leitfähigkeit einer untransfizierten HEK293-Zelle deutlich unterscheidet (Abbildung 3.1 A und B). Kmpv_{SP1} leitet K⁺ nur bei negativen Spannungen und ist demnach ein Einwärtsgleichrichter. Nach Rekonstitution des Kanalproteins Kmpv_{SP1} in einen planaren Lipid-Bilayer wird deutlich, dass die Einwärtsgleichrichtung auf die hohe Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Spannungen zurückzuführen ist, bei positiven Spannungen zeigt sich kein einziges Schaltereignis (Abbildung 3.1 E und F). Dieser Befund ist bemerkenswert, da eine Untereinheit des Kmpv_{SP1} aus nur zwei TMs besteht und über keinen Spannungssensor verfügt, wie es z.B. beim Shaker-Kanal der Fall ist (Papazian *et al.*, 1991; Papazian *et al.*, 1995; Liman *et al.*, 1991; Seoh *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist die Einwärtsgleichrichtung nicht auf eine spannungsabhängige Domäne (S4) zurückzuführen (Bezanilla, 2000; Hille, 2001; Yellen, 2002). Kir-Kanäle, welche wie Kmpv_{SP1} nur aus zwei TMs pro Untereinheit bestehen und keine Spannungsdomäne besitzen, zeigen dennoch eine Einwärtsgleichrichtung. Lange Zeit ging man von einer inhärenten Einwärtsgleichrichtung in diesen Kanälen aus. Es wurde vermutet, dass die Kir-Kanäle eine Struktur enthalten, welche die Einwärtsgleichrichtung bedingt, wie z.B. in spannungsabhängigen K⁺-Kanälen (Armstrong *et al.*, 1965). Allerdings konnte später gezeigt werden, dass die Einwärtsgleichrichtung in Kir-Kanälen auf einen Block des K⁺-Ausstroms durch intrazelluläre Kationen (wie z.B. Mg²⁺) oder Polyamine (wie z.B. Spermin/Spermidin) zurückzuführen ist (Lopatin *et al.*, 1994; Matsuda *et al.* 1987.; Fakler *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995).

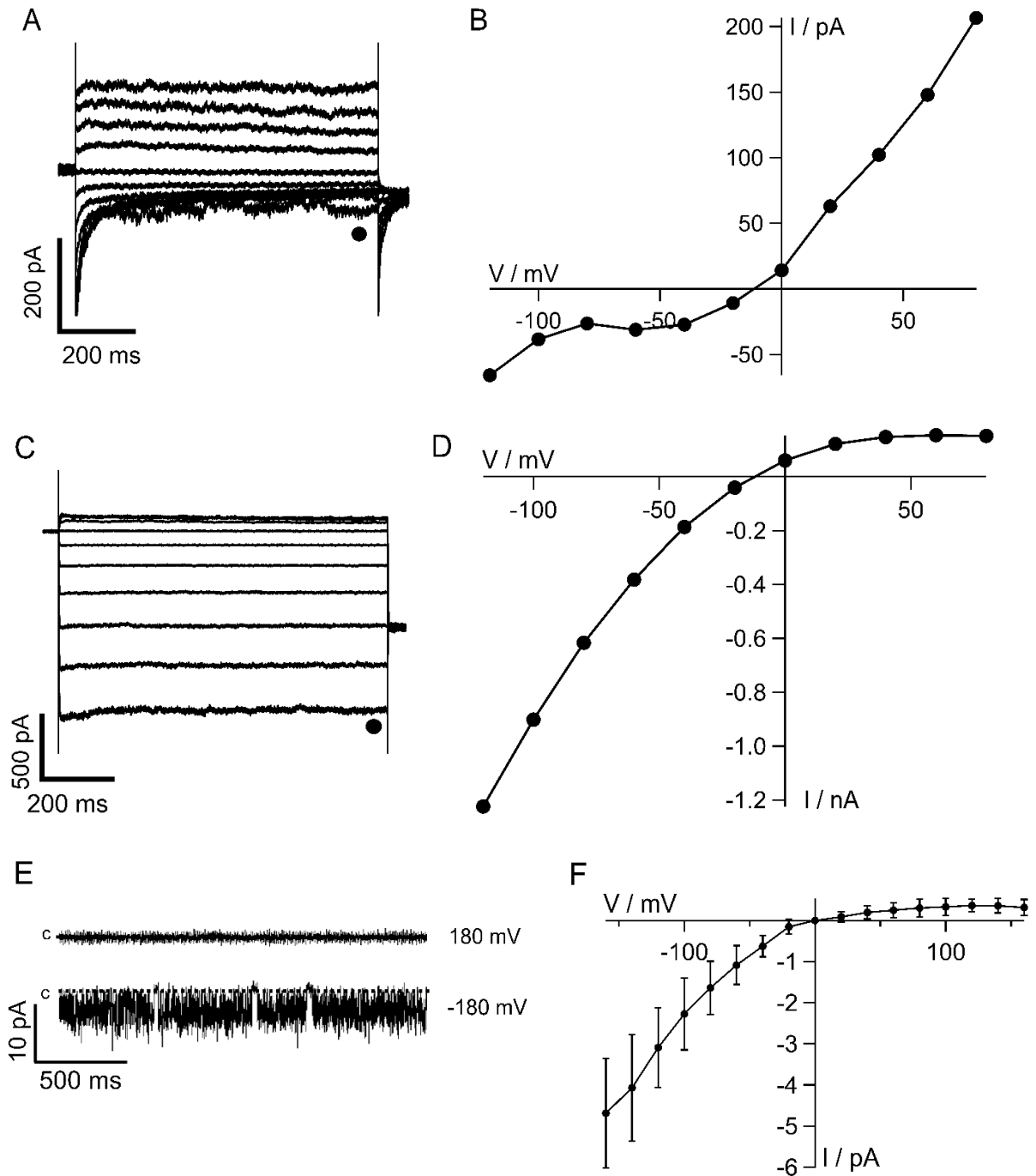


Abbildung 3.1: Kmpv_{SP1} zeigt eine Einwärtsgleichrichtung. Stromantwort einer untransfizierten HEK293-Zelle (A), einer Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle (C) und die dazugehörigen Strom-Spannungskurven aus den jeweiligen stationären Strömen (B und D). Die Stromantworten wurden in den Standard-Lösungen (50 mM K⁺-Lösung (extern) und 130 mM K⁺-Lösung (intern)) nach Anlegen des Standard-Pulsprotokolls (Anfangshaltespannung von 0 mV, Kommandospannungen von -120 mV bis 80 mV in 20 mV Schritten, Endhaltespannung von -80 mV) aufgenommen. Repräsentative Stromspuren mit Einzelkanalfluktuationen in symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung (pH 7,0) in einer DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen (E). C markiert den Geschlossenzustand. Die Stromspuren wurden digital bei 100 Hz gefiltert. Die Strom-Spannungskurven des mittleren zeitgemittelten Stroms (I) mit jeweiliger Standardabweichung (n=9) (F).

In anderen Studien wurde bereits der Einfluss von HEPES auf die Gleichrichtung von Kir-Kanälen untersucht. Diese Experimente haben gezeigt, dass dieser Puffer mit zunehmender Konzentration die Einwärtsgleichrichtung von Kir-Kanälen begünstigt (Guo und Lu, 2000). Deshalb wurde zunächst untersucht, ob es sich bei $Kmpv_{SP1}$ um einen inhärenten Einwärtsgleichrichter handelt, oder ob wie bei Kir-Kanälen, ein Block des Ausstroms durch Kationen oder HEPES für die Gleichrichtung verantwortlich ist.

Um zu untersuchen, ob HEPES für die Einwärtsgleichrichtung des $Kmpv_{SP1}$ verantwortlich ist, wurde die Aktivität von $Kmpv_{SP1}$ in Abwesenheit von 10 mM HEPES gemessen. HEPES ist normalerweise Bestandteil der Standard-Lösung. Für diese Experimente wurde auf die Lipid-Bilayer Technik zurückgegriffen, da es sich dabei um ein zellfreies System handelt und der virale K^+ -Kanal $Kmpv_{SP1}$ ohne äußere Einflüsse, ausschließlich in einer 100 mM K^+ -Lösung, gemessen werden kann. Außerdem lassen sich Aussagen über die Offenwahrscheinlichkeit und die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals besser treffen. Die Ströme wurden über einen Spannungsbereich von ± 180 mV aufgenommen. In Abbildung 3.2 sind exemplarische Stromspuren bei angegebenen Spannungen in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 mM HEPES dargestellt. In Anwesenheit von HEPES ist im positiven Spannungsbereich kein einziges Schaltereignis zu erkennen, im negativen Spannungsbereich ist ein starkes *Flicker-Gating* wahrzunehmen. Diese elektrophysiologischen Eigenschaften zeigen sich auch, wenn kein HEPES in der Messlösung vorhanden ist (Abbildung 3.2 B). Bei negativen Haltespannungen ist auch ohne HEPES im Medium ein starkes *Flicker-Gating* zu verzeichnen, hingegen ist bei positiven Spannungen kein Schaltereignis aufzuzeichnen. Aufgrund des *Flicker-Gatings* ist das Geschlossen- und Offenniveau nicht eindeutig auflösbar, weshalb für die Bestimmung der Stromamplituden der Zeit-gemittelte Strom ermittelt wurde. Bei Betrachtung der Strom-Spannungskurve ist kein signifikanter Unterschied in der Stromamplitude in An- und Abwesenheit von 10 mM HEPES zu erkennen. Die jeweiligen Amplituden liegen bei einer Referenzspannung von -100 mV bei ungefähr -2 pA (Abbildung 3.2 E). Daraus kann man schließen, dass ein Block durch HEPES als Ursache für eine Gleichrichtung ausgeschlossen werden kann.

In weiteren Untersuchungen wurde getestet, ob Kontaminationen von divalenten Kationen in den Medien für die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} verantwortlich sind. Dies ist durchaus möglich, wenn man bedenkt, dass die Kir-Kanäle eine sehr hohe Affinität für Mg²⁺ aufweisen (Nichols und Lopatin, 1997). Um etwaige Kontaminationen zu eliminieren, wurde die Kanalaktivität in einer DPhPC-Membran in An- und Abwesenheit von 1 mM EDTA gemessen. EDTA ist ein Chelator, welcher Metallionen mit einer Ladungszahl von mindestens zwei komplexiert (Oviedo und Rodríguez, 2003).

Die Experimente mit und ohne den Chelator zeigen, dass die Einwärtsgleichrichtung auch in Anwesenheit von 1 mM EDTA immer noch vorhanden ist. Zunächst wurden Stromspuren ohne EDTA in der Standard-Lösung mit 100 mM K⁺ und 10 mM HEPES (pH 7,0) aufgenommen (Abbildung 3.2 C). In den Messergebnissen sind die bereits oben genannten elektrophysiologischen Eigenschaften, nämlich ein schnelles *Gating* und eine Einwärtsgleichrichtung, zu erkennen. Anschließend wurde 1 mM EDTA hinzugegeben, um Verunreinigung durch zweiwertige Kationen (wie z.B. Mg²⁺) in der Messlösung zu eliminieren. Die dazugehörigen Stromspuren sind in Abbildung 3.2 D dargestellt. Im positiven Spannungsbereich sind weiterhin keine Schaltereignisse zu erkennen. Im negativen Spannungsbereich ist wie bei den vorherigen Messungen ein *Flicker-Gating* aufzuzeichnen, mit einer Stromamplitude von -2 pA bei -100 mV (Abbildung 3.2 E).

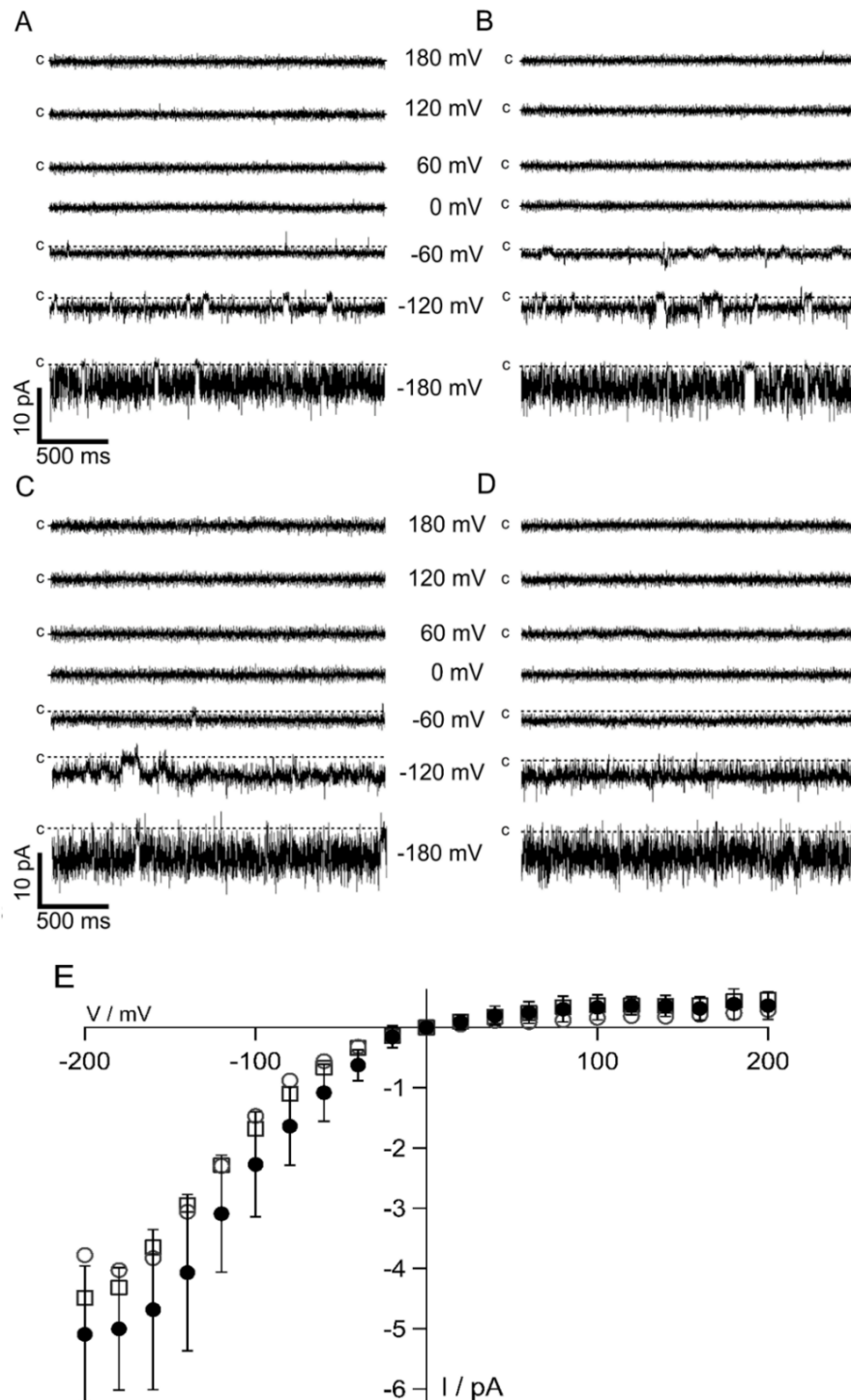


Abbildung 3.2: Die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} ist unabhängig von divalenten Kationen und HEPES. Repräsentative Stromspuren mit Einzelkanalfuktuationen in symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung (pH 7,0) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 mM HEPES. Kanalaktivität wurde in einer DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen gemessen. Repräsentative Stromspuren in Abwesenheit (C) und Anwesenheit (D) von 1 mM EDTA. C markiert den Geschlossenzustand. Die Stromspuren wurden digital bei 500 Hz gefiltert. Die Strom-Spannungskurven des zeitgemittelten Stroms (I) in Abwesenheit von HEPES (offene Kreise), Anwesenheit von EDTA (offene Vierecke) und der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus sieben Messungen in einer 100 mM K⁺-Lösung und 10 mM HEPES (ausgefüllte Kreise) (E).

In weiteren Messungen wurde in der gleichen Versuchsanordnung Kanalschalten über einen längeren Zeitraum gemessen. Diese Versuche wurden durchgeführt, weil aus Messungen mit Kir-Kanälen bekannt ist, dass die Proteine wegen ihrer hohen Affinität für divalenten Kationen die blockierenden Ionen nur sehr langsam aus ihrer Bindungstasche entlassen (Nichols und Lopatin, 1997). Um ein eventuell langsames Auswaschen von blockierenden Ionen zu verfolgen, wurde die Aktivität von Kmpv_{SP1} zunächst in Abwesenheit von EDTA, bei Haltespannungen von ± 200 mV für 10 s, gemessen; anschließend wurde 1 mM EDTA in die *cis*- und *trans*-Kammer hinzugegeben. Danach wurde eine weitere Messung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach einer Wartezeit von 30 min wurde eine erneute Messung gestartet, um sicher zu stellen, dass EDTA alle mehrwertigen Kationen komplexiert hat. Auch in dieser Messung zeigt sich eine deutliche Einwärtsgleichrichtung mit Aktivität bei negativen Spannungen und keinem Kanalschalten im positiven Spannungsbereich (Abbildung 3.3).

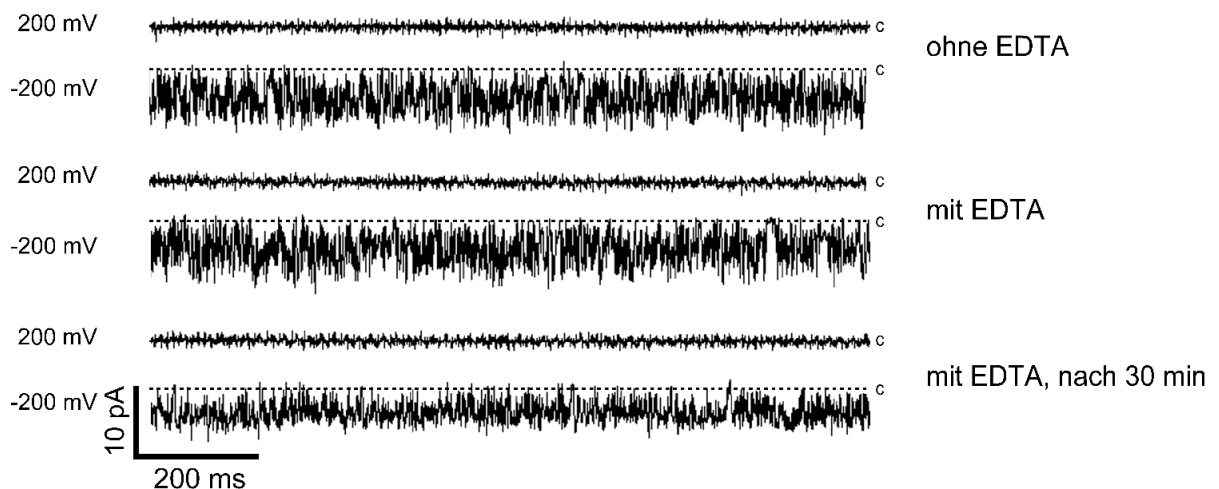


Abbildung 3.3: Die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} ist unabhängig von divalenten Kationen. Repräsentative Stromspuren mit Einzelkanalfluktuationen bei symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung (pH 7,0) in Abwesenheit (oben), direkt nach Zugabe von EDTA (Mitte) und nach anschließender Wartezeit von 30 min (unten). Kanalschalten wurde in einer DPhPC-Membran bei einer Referenzspannung von ± 200 mV aufgenommen. Die Stromspuren wurden digital bei 500 Hz gefiltert. C markiert den Geschlossenzustand.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder HEPES noch Mg²⁺, welches durch die Anwesenheit von EDTA komplexiert wird, einen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung haben und diese nicht dadurch bedingt ist. Die Einwärtsgleichrichtung muss daher auf einen inhärenten Faktor zurückzuführen sein, der in Kapitel 6.3 weiter untersucht wurde.

Außerdem wurde untersucht, ob der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} andere funktionelle Eigenschaften aufweist, die auch für Kir-Kanäle typisch sind. Dazu wurde die Leitfähigkeit in Abhängigkeit der externen K⁺-Konzentration ermittelt. Für Kir-Kanäle (mit Ausnahme von Kir 7.1) ist bekannt, dass sich die Leitfähigkeit proportional zur Quadratwurzel der externen K⁺-Konzentration verhält (Hagiwara und Takahashi, 1974; Lopatin *et al.*, 1996; Makhina *et al.*, 1994; Perier *et al.*, 1994; Sakmann und Trube, 1984). Diese distinkte Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der externen K⁺-Konzentration zeigt, dass der Transport durch Kir-Kanäle nicht der Goldman-Hodgkin-Katz Permeabilitäts-Theorie folgt (Goldman, 1943; Hodgkin und Katz, 1949).

Um zu überprüfen, ob die Einwärtsgleichrichtung von der externen K⁺-Konzentration abhängig ist, wurde Kmpv_{SP1}::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und die makroskopischen Ströme mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration aufgenommen. Die interne K⁺-Konzentration wurde bei allen Experimenten konstant bei 130 mM gehalten. Die externe K⁺-Konzentration wurde, mit Hilfe der Perfusionskammer, ausgetauscht. Hierfür wurden Konzentrationen von 50-125 mM K⁺ verwendet. Für alle Stromantworten wurde das Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, angelegt. Abbildung 3.4 A zeigt die typische Stromantwort einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer 50 mM K⁺-Lösung (extern). Es ist eine deutliche Einwärtsgleichrichtung zu erkennen. Mit zunehmenden K⁺-Konzentrationen in der externen Lösung wird der Ionen Einstrom größer, der Ausstrom bleibt annähernd gleich (Abbildung 3.4 B, C und D). In der Strom-Spannungskurve zeigt sich bei 50 mM K⁺ ein Einstrom von 950 pA bei -100 mV und bei 80 mV ein Ausstrom von 80 pA (Abbildung 3.4 A und E). Bei einer Konzentration von 125 mM K⁺ zeigt Kmpv_{SP1} einen Einstrom von 1400 pA bei -100 mV, der Ausstrom liegt bei 80 mV bei 100 pA (Abbildung 3.4 D und E).

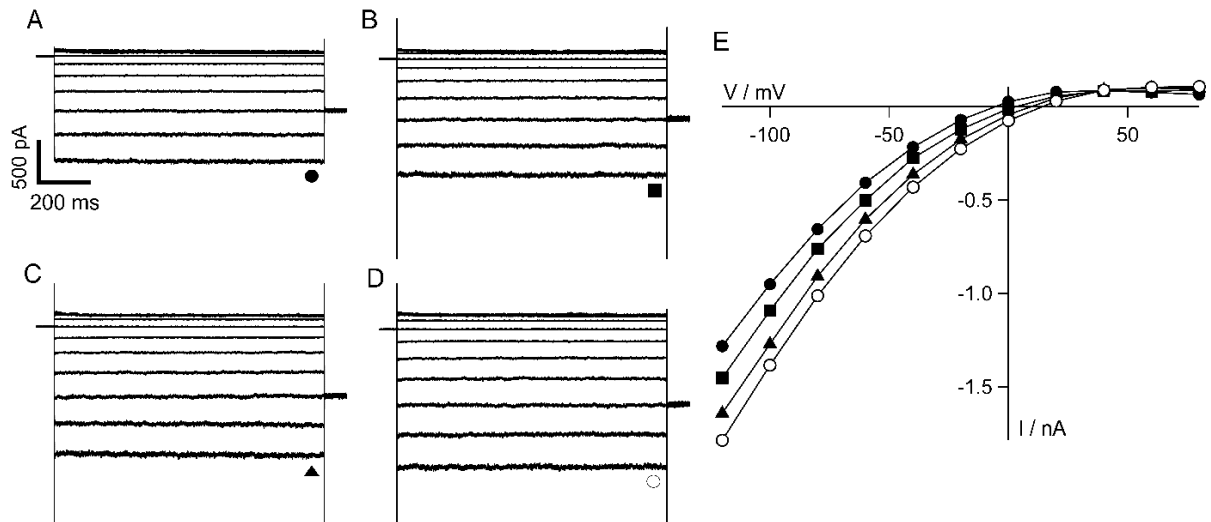


Abbildung 3.4: Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} bleibt bei verschiedenen K⁺-Konzentrationen erhalten. Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle mit 50 mM K⁺ (A, geschlossene Kreise), 75 mM K⁺ (B, geschlossene Vierecke), 100 mM K⁺ (C, geschlossene Dreiecke) und 125 mM K⁺ (D, offene Kreise) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mittels Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in E wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A,B,C und D) dargestellt.

Die Daten zeigen weiter, dass sich das Umkehrpotential mit zunehmender K⁺-Konzentration in den positiveren Spannungsbereich verschiebt (Abbildung 3.5). Das Umkehrpotential hängt linear vom natürlichen Logarithmus der externen K⁺-Konzentration ab. Die Abhängigkeit lässt sich mit der Nernst-Gleichung beschreiben:

$$E_K = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{a([K^+]_o)}{a([K^+]_i)} \right) \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Dabei ist E_K das Nernst-Potential für K⁺, R die Gaskonstante ($8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$), T die absolute Temperatur (298,15 K), z die Anzahl der übertragenen Elektronen (für K⁺ gleich 1), F die Faraday-Konstante ($96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$), $a([K^+]_o)$ die K⁺-Aktivität der externen Lösung, und $a([K^+]_i)$ die K⁺-Aktivität der internen Lösung. Die Aktivität wurde mit Hilfe der Aktivitätskoeffizienten aus Hamer und Wu (1972) berechnet (Hamer und Wu, 1972).

Nach Umformen der Gleichung 3.1 ergibt sich nachfolgende Gleichung:

$$E_K = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(a([K^+]_o)) - \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(a([K^+]_i)) \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Die interne K^+ -Konzentration bleibt während der gesamten Messreihe konstant, weshalb sich $\frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(a([K^+]_i))$ als Konstante b und $\frac{R \cdot T}{z \cdot F}$ als Konstante c zusammenfassen lassen. Daraus resultiert folgende Gleichung:

$$E_K = c \cdot \ln(a([K^+]_o)) - b \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

Die Messpunkte lassen sich mit 18,8 mV für c und 71,8 mV für b am besten beschreiben. Obwohl sich das Umkehrpotential also proportional zum natürlichen Logarithmus der externen K^+ -Aktivität verhält, sind die gemessenen Umkehrpotentiale deutlich positiver als sie für eine rein K^+ leitfähige Membran zu erwarten wäre. Des Weiteren ist auch die Abhängigkeit des Umkehrpotentials von der externen K^+ -Aktivität schwächer als die Abhängigkeit des theoretischen Nernst-Potentials von der externen K^+ -Aktivität. Die theoretischen Nernst-Potentiale sind zum Vergleich mit den experimentell gemessenen Werten in Abbildung 3.5 dargestellt. Es ist nicht zu erwarten, dass die experimentell bestimmten Umkehrpotentiale mit den theoretischen Nernst-Potentialen übereinstimmen, da bei der Ermittlung des theoretischen Umkehrpotentials von einer Membran ausgegangen wird, die ausschließlich K^+ leitet. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass die experimentellen und theoretischen Werte vor allem bei niedrigen K^+ -Aktivitäten voneinander abweichen, denn hier besitzen andere Ionen in der Messlösung einen größeren Einfluss.

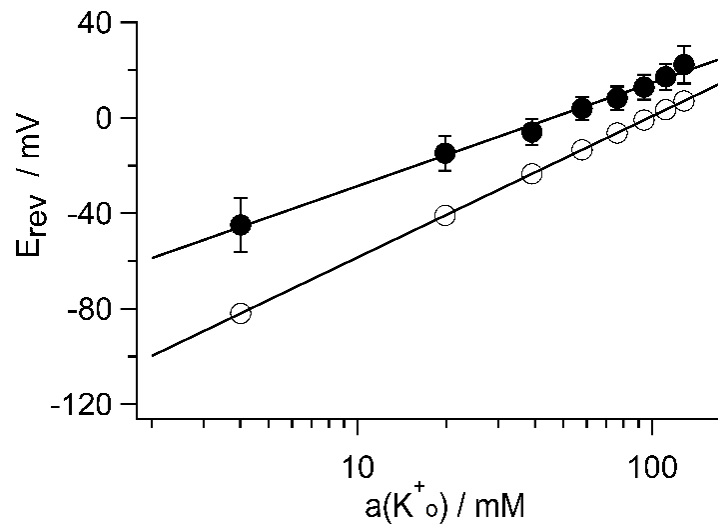


Abbildung 3.5: $Kmpv_{SP1}$ verhält sich bei Veränderung der externen K^+ -Konzentration wie Kir-Kanäle. Dargestellt ist das ermittelte Umkehrpotential (ausgefüllte Kreise; mit Standardabweichung; 5 mM, $n=19$; 25 mM, $n=7$; 50 mM, $n=30$; 75 mM, $n=12$; 100 mM, $n=12$; 125 mM, $n=11$; 150 mM, $n=7$; 175 mM, $n=4$) und das theoretische Umkehrpotential (offene Kreise) als Funktion gegen die K^+ -Aktivität in der externen Lösung. Die Messpunkte der gemessenen Umkehrpotentiale wurden mit der Gleichung 3.3 und das theoretische Umkehrpotential mit Gleichung 3.1 gefittet.

Außerdem zeigt $Kmpv_{SP1}$ bei Erhöhung der externen K^+ -Konzentration, eine erhöhte Leitfähigkeit. Zur Veranschaulichung wurde die *slope* Leitfähigkeit zwischen -120 und -80 mV ermittelt und gegen die externe K^+ -Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.6). Hierfür wurden die relative *slope* Leitfähigkeiten aufgetragen, um den Einfluss der Zellgröße und somit die Anzahl der Kanäle nicht zu berücksichtigen. Die *slope* Leitfähigkeit bei einer externen K^+ -Konzentration von 5 mM wurde dazu auf 1 normiert. Bereits bei anderen Kir-Kanälen konnte gezeigt werden, dass bei Erhöhung der externen K^+ -Konzentration, die *slope* Leitfähigkeit steigt (Hibino *et al.*, 2010). Wie oben schon erwähnt ist für Kir Kanäle bekannt, dass sich die Leitfähigkeit proportional zur Quadratwurzel der externen K^+ -Konzentration verhält (Hagiwara und Takahashi, 1974; Lopatin *et al.*, 1996; Makhina *et al.*, 1994; Perier *et al.*, 1994; Sakmann und Trube, 1984). Um zu überprüfen, ob dies auch auf $Kmpv_{SP1}$ zutrifft, wurden die Datenpunkte wie in der Studie von Perier und Mitarbeitern mit folgender Funktion gefittet (Perier *et al.*, 1994):

$$g = \bar{g} \left(\frac{[K^+]_o}{mM} \right)^x \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

Dabei ist g die *slope* Leitfähigkeit [nS], \bar{g} die *slope* Leitfähigkeit bei einer externen K^+ -Konzentration von 1 mM unter gegebenen Messbedingungen (konstante interne K^+ -Konzentration), $[K^+]_o$ die externe K^+ -Konzentration und x eine Konstante.

Die Messdaten werden am besten mit 0,36 für x beschrieben. Die *slope* Leitfähigkeit des $Kmpv_{SP1}$ ist folglich nicht wie im Falle der Kir-Kanäle proportional zur Quadratwurzel der externen K^+ -Konzentration, sondern proportional zur Kubikwurzel der externen K^+ -Konzentration:

$$g \approx \bar{g} \left(\frac{[K^+]_o}{mM} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Gleichung 3.5})$$

Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit zur externen K^+ -Konzentration, wie sie bereits bei dem einwärtsgerichtenden HIR-Kanal (*hippocampal inward rectifier*) untersucht wurde (Perier *et al.*, 1994). Bei der doppelten logarithmischen Auftragung der *slope* Leitfähigkeit gegen die externe K^+ -Konzentration ergibt sich auch bei diesem Kanal eine annähernde lineare Abhängigkeit (Perier *et al.*, 1994, Hibino *et al.*, 2010).

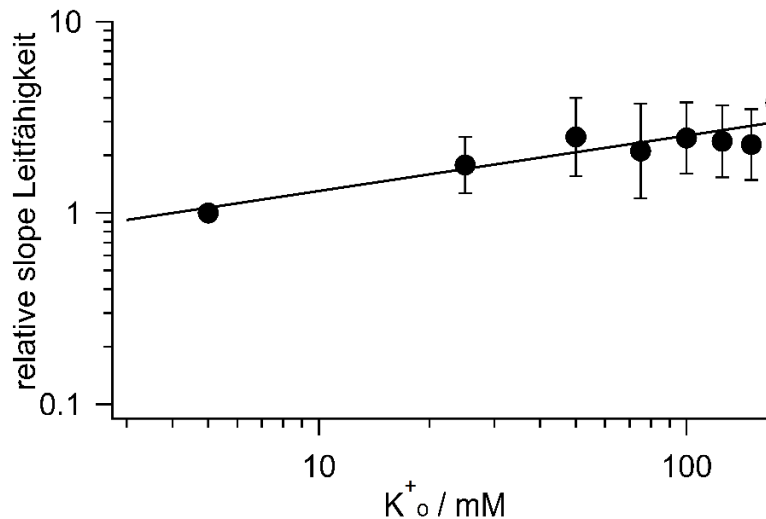


Abbildung 3.6: Die relative *slope* Leitfähigkeit des $Kmpv_{SP1}$ verhält sich etwa proportional zur Kubikwurzel der externen K^+ -Konzentration. Dargestellt ist das geometrische Mittel der *slope* Leitfähigkeit als Funktion der externen K^+ -Konzentration mit entsprechender Abweichung (5 mM, n=18; 25 mM, n=7; 50 mM, n=20; 75 mM, n=7; 100 mM, n=7; 125 mM, n=7; 150 mM, n=7; 175 mM, n=4).

Die Messdaten können näherungsweise mit der Funktion $g \approx \bar{g} \left(\frac{[K^+]_o}{mM} \right)^{\frac{1}{3}}$ beschrieben werden.

3.1.1. Kmpv_{SP1} ist sensitiv für typische K⁺-Kanalblocker

Ba²⁺ ist ein typischer K⁺-Kanalblocker, der den Ionenstrom in beide Richtungen blockieren kann. Die Stärke und Kinetik des Blocks ist stark spannungs- und konzentrationsabhängig (Standen und Stanfield, 1978; Armstrong und Taylor, 1980). Da Ba²⁺ mit 1,35 Å annähernd den gleichen Durchmesser wie K⁺ mit 1,33 Å aufweist, gelangt Ba²⁺ in den Selektivitätsfilter. Es konkurriert dort mit K⁺ um die gleiche Bindestelle innerhalb der wässrig gefüllten Pore (Standen und Stanfield, 1987). Aufgrund seiner zweiwertigen Ladung kommt es jedoch zu einer starken Bindung in dem Selektivitätsfilter und damit zu einem Block der K⁺-Leitfähigkeit (Jiang und MacKinnon, 2000).

In dieser Arbeit wurde die Sensitivität des viralen K⁺-Kanals für Ba²⁺ genauer untersucht. Hierfür wurde Kmpv_{SP1}::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und die makroskopischen Ströme mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. Die Ströme wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die interne K⁺-Konzentration betrug 130 mM und die externe 50 mM; in der externen K⁺-Lösung war Ba²⁺ über einen Konzentrationsbereich zwischen 0 μM und 1 mM Ba²⁺ vorhanden. Die unterschiedlichen Ba²⁺-Konzentrationen wurden mit Hilfe einer Perfusionskammer eingestellt. Repräsentative Stromantworten mit den dazugehörigen Strom-Spannungskurven sind in Abbildung 3.7 dargestellt. In Abwesenheit von Ba²⁺ ist die Einwärtsgleichrichtung des Kanals deutlich zu erkennen; bei -100 mV zeigt Kmpv_{SP1} einen Einstrom von 570 pA, bei 80 mV liegt der Ausstrom bei 60 pA (Abbildung 3.7 A). In Abbildung 3.7 B ist die Stromantwort der gleichen Zelle nach Zugabe von 1 μM Ba²⁺ zur externen Lösung zu sehen. In Anwesenheit der geringen Ba²⁺-Konzentration ist kaum eine Reduktion des Einstroms zu erkennen, dieser liegt bei -100 mV bei 530 pA (Abbildung 3.7 B). Nach Erhöhung der Ba²⁺-Konzentration auf 10 μM Ba²⁺ wird der Einstrom bei -100 mV um 32%, im Vergleich zur Stromantwort ohne Ba²⁺, reduziert. (Abbildung 3.7 C). Durch eine weitere Erhöhung des Blockers auf 100 μM reduziert sich der Einstrom drastisch um 80% bei -100 mV (Abbildung 3.7 D). Eine erneute Erhöhung der Ba²⁺-Konzentration auf 1 mM führt zu einem fast vollständigen Block des Einstroms; bei -100 mV ist der Strom zu 97 % für der Ba²⁺ freien Lösung blockiert. Der Einfluss der verschiedenen externen Ba²⁺-Konzentrationen wird auch in der Strom-Spannungskurve deutlich (Abbildung 3.7 F). Mit zunehmender Ba²⁺-Konzentration wird der Block des Einstroms zunehmend größer.

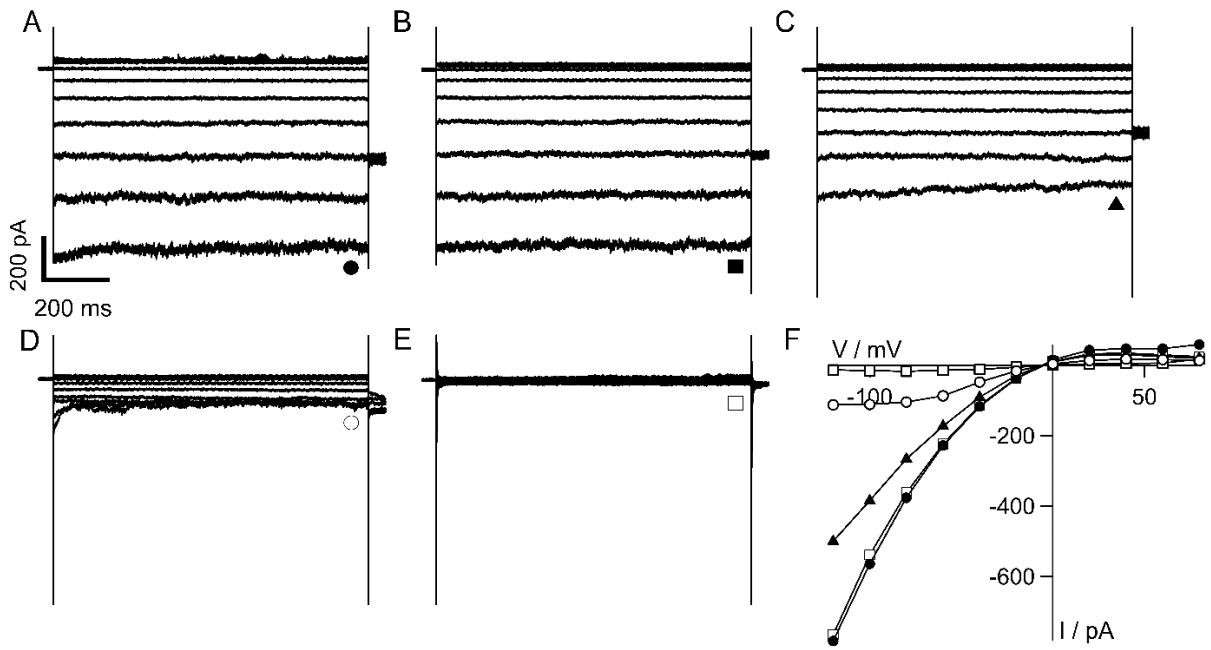


Abbildung 3.7: Kmpv_{SP1} zeigt eine hohe Sensitivität für extrazelluläres Ba²⁺. Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer 50 mM K⁺-Lösung in Abwesenheit von Ba²⁺ (A, geschlossene Kreise), 1 μM Ba²⁺ (B, geschlossene Vierecke), 10 μM Ba²⁺ (C, geschlossene Dreiecke), 100 μM Ba²⁺ (D, offenen Kreise) und 1 mM Ba²⁺ (E, offenen Vierecke) in der externen Lösung. Die Ströme wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in F wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A,B,C, D und E) dargestellt.

Um die Konzentrationsabhängigkeit des Ba²⁺-Blocks zu quantifizieren, wurden die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung des relativen Blocks bei einer Referenzspannung von -100 mV gegen die Ba²⁺-Konzentration aufgetragen. Bei Erhöhung der externen Ba²⁺-Konzentration kann eine zunehmende Blockierung des Einstroms beobachtet werden (Abbildung 3.8 A). Die Dosis-Wirkungskurve zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Die Messdaten wurden mit der modifizierten Hill-Gleichung gefittet (Hill, 1910, Hill, 1913; Goutelle *et al.*, 2008):

$$\text{Inh} = \frac{[\text{Ba}^{2+}]^n}{K_D + [\text{Ba}^{2+}]^n} \quad (\text{Gleichung 3.6})$$

Inh für Inhibition gibt den relativen Block des Stroms, [Ba²⁺] die externe Ba²⁺-Konzentration, *n* die Anzahl der Bindestellen (Hill-Faktor) und *K_D* die externe Ba²⁺-Konzentration für einen halbmaximalen Block, an.

Die Messdaten lassen sich mit einem Hill-Faktor von 1 am besten beschreiben. Aus dem Fit kann der K_D -Wert, welcher ein Maß für die Affinität eines Proteins zu seinem Liganden ist, ermittelt werden. Je kleiner der K_D -Wert, desto höher ist die Affinität zu seinem Liganden. Dieser liegt für $K_{mpV_{SP1}}$ bei einer Referenzspannung von -100 mV bei $13,5 \mu\text{M}$.

In Abbildung 3.8 B sind die K_D -Werte als Funktion der Spannung aufgetragen. Die Analyse zeigt, dass der Ba^{2+} -Block spannungsabhängig ist, wobei der K_D -Wert mit zunehmender negativer Haltespannung sinkt. Bei -40 mV beträgt er $52 \mu\text{M}$, hingegen liegt er bei -120 mV nur bei $10 \mu\text{M}$ und ist somit um das 5-fache geringer. Der spannungsabhängige Ba^{2+} -Block lässt sich gut mit dem Woodhull-Modell beschreiben (Woodhull, 1973):

$$K_D(V) = K_D(0) \cdot \exp\left(\frac{z \cdot F \cdot \lambda \cdot V}{R \cdot T}\right) \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

$K_D(V)$ ist die Dissoziationskonstante bei der Membranspannung V , $K_D(0)$ die Dissoziationskonstante bei $V = 0 \text{ mV}$, R die Gaskonstante ($8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$), T die absolute Temperatur ($298,15 \text{ K}$), z die Valenz des Ions ($z=2$ für Ba^{2+}), F die Faraday-Konstante ($96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$) und λ der Anteil des Membranpotentials, der bis zur Ba^{2+} -Bindestelle abgefallen ist.

Aus dem Woodhull-Modell ergibt sich ein Wert für λ . Im Falle einer einfachen Bindungsreaktion, in der das Ba^{2+} nicht durch die Pore permeieren kann, stellt λ den Anteil des Membranpotentials dar, der am Ort der Ba^{2+} -Bindestelle bereits abgefallen ist. λ kann in diesem Fall Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Dabei gilt: je größer λ , desto größer ist die Strecke, die Ba^{2+} vom extrazellulären Raum zur Ba^{2+} Bindestelle zurücklegen muss. Durch Fitten der aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten K_D -Werte mit Gleichung 3.7 ergibt sich für λ ein Wert von 0,26, was einer moderaten Spannungsabhängigkeit entspricht.

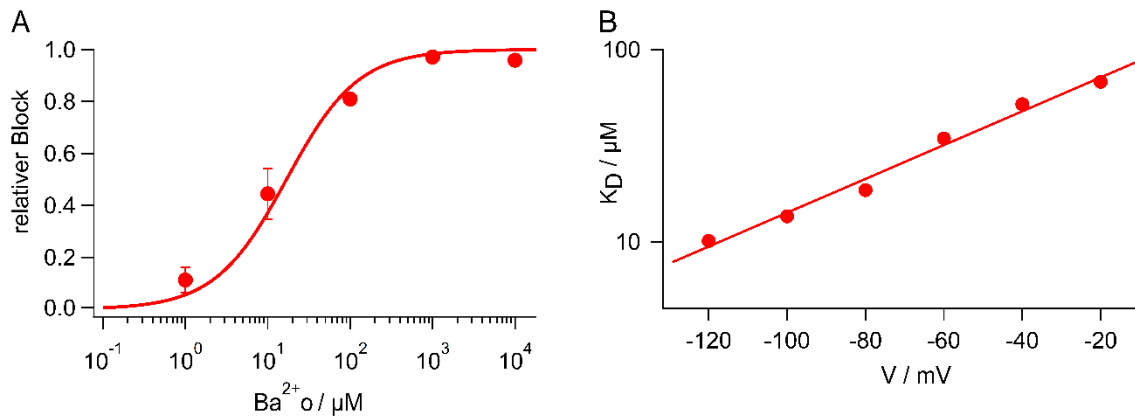


Abbildung 3.8: Kmpv_{SP1} zeigt eine hohe Sensitivität für Ba²⁺. A zeigt den relativen Block aufgetragen gegen die Ba²⁺-Konzentration bei -100 mV. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert mit Standardabweichung (1 μ M, n=3; 10 μ M, n=3; 100 μ M, n=3; 1000 μ M, n=3; 10 mM, n=6). Die Messdaten wurden mit der Hill-Gleichung gefittet (Gleichung 3.6). B stellt die aufgetragenen K_D-Werte gegen die Spannungen in einem Bereich von -120 bis -20 mV dar. Die Messdaten wurden mit der Woodhull-Gleichung (Gleichung 3.7) gefittet.

Die Daten zeigen, dass der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} eine Sensitivität für Ba²⁺ aufweist, welche spannungs- und konzentrationsabhängig ist.

In weiteren Experimenten wurde die Sensitivität des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} für Cs⁺ untersucht. Auch Cs⁺ zählt zu den typischen K⁺-Kanalblockern und blockt z.B. den Kir2.1 in einer konzentrations- und spannungsabhängigen Weise (Llobet *et al.*, 2001).

Um die elektrophysiologischen Auswirkungen von Cs⁺ auf den viralen K⁺-Kanal zu untersuchen, wurde Kmpv_{SP1}::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. Die interne K⁺-Konzentration bleibt konstant bei 130 mM. Mittels einer Perfusionskammer wurde die externe Lösung einer Zelle verändert, so dass die Stromantworten der Zelle auf ein Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, zunächst in Abwesenheit von Cs⁺ und anschließend in Anwesenheit von 1 und 10 mM Cs⁺ registriert wurden; die externe K⁺-Konzentration blieb in allen Experimenten konstant bei 50 mM. In Abwesenheit von Cs⁺ zeigt der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} einen Einstrom von 670 pA bei -100 mV (Abbildung 3.9 A). Dieser Einstrom reduziert sich in Anwesenheit von 1 mM Cs⁺ um 18% auf 550 pA (Abbildung 3.9 B). Nach der Zugabe von 10 mM Cs⁺ zeigt sich ein verstärkt ausgeprägter spannungsabhängiger Block. Die Strom-Spannungskurve besitzt bei negativen Spannungen eine negative Kennlinie, die typischerweise darauf zurückzuführen ist, dass Cs⁺ durch negative Spannungen vermehrt in die Kanalpore hineingezogen wird und den Kanal

blockiert. Die Konzentrationsabhängigkeit der Blockierung wird auch in den Strom-Spannungskurven deutlich, in welcher die stationären Ströme aufgetragen wurden (Abbildung 3.9 D). Mit zunehmender Spannung steigt der Block des K^+ -Einstroms. Eine Spannungsabhängigkeit des Blocks durch Cs^+ ist deutlich in Abbildung 3.9 E zu erkennen. Hier sind die Mittelwerte des relativen Blocks in Anwesenheit von 1 mM Cs^+ (geschlossene Kreise) und 10 mM Cs^+ (offene Kreise) gegenüber der Spannung aus sechs unabhängigen Messungen aufgetragen.

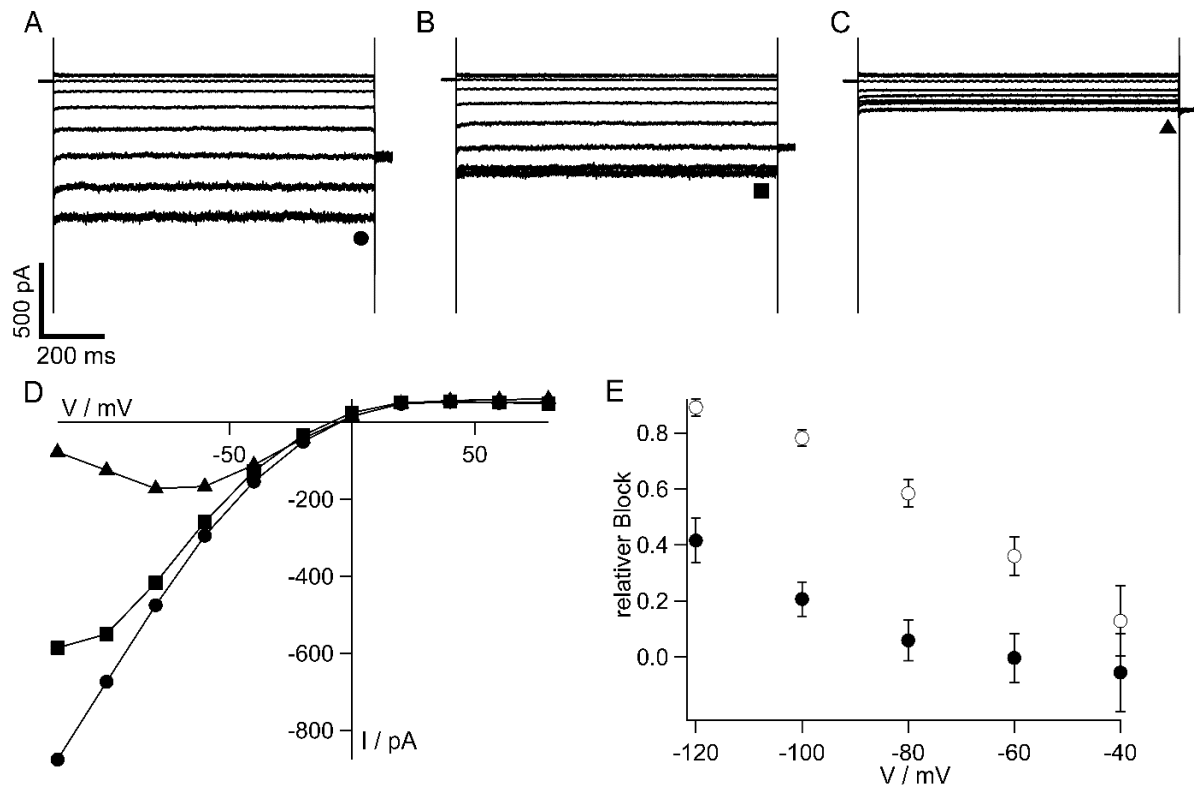


Abbildung 3.9: Kmpv_{SP1} ist sensitiv für Cs^+ . Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer 50 mM K^+ -Lösung in Abwesenheit von Cs^+ (A, geschlossene Kreise) und Anwesenheit von 1 mM Cs^+ (B, geschlossene Vierecke) und 10 mM Cs^+ (C, geschlossene Dreiecke) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mittels Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in D wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A,B und C) dargestellt. In E ist der mittlere relative Block in Anwesenheit von 1 mM Cs^+ (geschlossenen Kreise) und 10 mM Cs^+ (offenen Kreise) mit entsprechender Standardabweichung aus sechs unabhängigen Messungen gegen die jeweilige Spannung aufgetragen.

Als Resümee aus diesen Experimenten kann festgehalten werden, dass der virale K^+ -Kanal Kmpv_{SP1} eine deutliche Sensitivität für die K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} und Cs^+ aufweist. Der jeweilige Block ist abhängig von der Konzentration des Blockers und der angelegten Spannung. Die Spannungsabhängigkeit lässt darauf schließen, dass die blockierenden Kationen, getrieben

durch die Spannung, von der Außenlösung in den Selektivitätsfilter eindringen und so den K^+ -Strom inhibieren.

3.1.2. Die Selektivität von Kmpv_{SP1} für Rb^+ und Na^+

K^+ -Kanäle leiten vor allem K^+ -Ionen über die Plasmamembran. Aber auch andere Ionen werden zu einem geringeren Maße transportiert. So leiten sie Rb^+ etwa genauso gut, wie K^+ . Die kleinsten Alkalimetalle, wie Na^+ oder Li^+ hingegen, werden kaum oder gar nicht geleitet. Na^+ wird ca. 10.000-mal schlechter durch viele K^+ -Kanäle geleitet als K^+ . Dies liegt an der Struktur des Filters. K^+ streift seine Hydrathülle beim Durchtritt durch die engste Stelle des K^+ -Kanals, den Selektivitätsfilter, ab und die Carbonyl-Sauerstoffatome der Aminosäuren im Selektivitätsfilter ahmen diese nach (Doyle *et al.*, 1998). Na^+ sind mit einem Durchmesser von 0,95 Å deutlich kleiner als K^+ mit 1,33 Å, weshalb sie im Selektivitätsfilter nicht ausreichend stabilisiert werden können (Abbildung 1.5). Aus diesem Grund ist der Durchtritt für Na^+ durch den K^+ -Kanal erschwert.

In den folgenden Experimenten wurde die Selektivität des viralen K^+ -Kanals Kmpv_{SP1} für weitere Kationen, Na^+ und Rb^+ , untersucht.

Zuerst wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften in Anwesenheit von Rb^+ betrachtet. Hierfür wurde der virale K^+ -Kanal Kmpv_{SP1}::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. In allen Messungen wurde das Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, angelegt. Zunächst wurden die Standard-Lösungen verwendet, im Laufe des Experimentes wurde die externe Lösung, mit Hilfe der Perfusionskammer, gegen eine Lösung mit 50 mM Rb^+ ausgetauscht. In Abbildung 3.10 A ist eine repräsentative Stromantwort einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer externen Lösung mit 50 mM K^+ dargestellt. Die typische Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} ist zu erkennen. Nach Austausch der externen K^+ -Lösung durch 50 mM Rb^+ bei der gleichen Zelle reduziert sich der Einstrom bei -100 mV auf die Hälfte (Abbildung 3.10 B). Während der Einstrom in der Beispielmessung in einer Lösung mit 50 mM K^+ 530 pA beträgt, reduziert er sich in 50 mM Rb^+ auf 280 pA. Dies wird auch in den Strom-Spannungskurven, welche aus den stationären Strömen der Stromantworten in A und B aufgetragen wurden, deutlich. Im Mittel liegt der Einwärtsstrom bei -100 mV in einer 50 mM K^+ -Lösung bei $862,18 \pm 554,7$ pA (n=64) und bei einer 50 mM Rb^+ -Lösung bei $518,75 \pm 309,46$ pA (n=9). Neben der Reduktion des Einwärtsstroms führt der Austausch von K^+ zu Rb^+ im Medium zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials in den negativen Spannungsbereich. Dieses liegt bei der exemplarischen Messung in 50 mM K^+ bei -7,6 mV; durch Austausch von K^+

gegen Rb^+ verschiebt sich die Umkehrspannung zu $-26,9 \text{ mV}$ (Abbildung 3.10 B). Im Mittel liegt das Umkehrpotential in einer 50 mM K^+ -Lösung bei $-6,62 \pm 2,50 \text{ mV}$ ($n=64$) und in 50 mM Rb^+ -Lösung bei $-25,38 \pm 4,38 \text{ mV}$ ($n=9$).

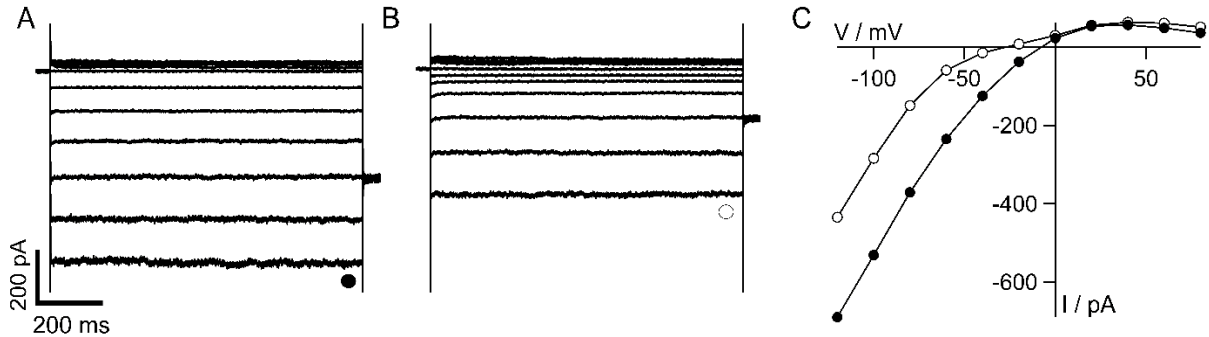


Abbildung 3.10: Kmpv_{SP1} leitet Rb^+ schlechter als K^+ . Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K^+ (A, geschlossene Kreise) und 50 mM Rb^+ (B, offenen Kreise) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mittels Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt.

Aus der Reduktion des Stromes kann man festhalten, dass der virale K^+ -Kanal Kmpv_{SP1} Rb^+ um die Hälfte schlechter leitet als K^+ . Dies bestätigt sich auch durch den Shift des Umkehrpotentials in den negativen Spannungsbereich, nach Austausch von K^+ gegen Rb^+ . Das Verhältnis der Permeabilität (P_B/P_A) wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet (Hille, 2001):

$$\Delta E_{rev} = E_{rev,B} - E_{rev,A} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{P_B [B]_o}{P_A [A]_o} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Wobei E_{rev} für das Umkehrpotential in der Anwesenheit von 50 mM monovalenter Kationen in der externen Lösung ($[A]_o$ oder $[B]_o$), R die Gaskonstante ($8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$), T die absolute Temperatur ($298,15 \text{ K}$), F die Faraday-Konstante ($96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$) und P die Permeabilität steht.

Hieraus ergibt sich aus der Verschiebung der Umkehrspannung eine relative Permeabilität des Kanals für Rb^+ zu K^+ von $0,5 \pm 0,06$ ($n=9$) (Gleichung 3.8). Die Verschiebung der Umkehrspannung steht so im Einklang mit der Konstanten-Feld Theorie (Hille, 2001). Diese trifft zu, wenn die Ionenbewegung abhängig von ihrer Konzentration und der Spannung ist und wenn das elektrische Feld in der Membran konstant bleibt.

Im nächsten Experiment wurde die Leitfähigkeit des viralen K^+ -Kanals für Na^+ untersucht. Hierfür wurde $Kmpv_{SP1}$:EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. In Abbildung 3.11 A ist eine repräsentative Stromantwort einer HEK293-Zelle, welche $Kmpv_{SP1}$:EGFP exprimiert, dargestellt. Die interne Lösung enthält 130 mM K^+ und die externe 50 mM K^+ . Durch eine Perfusionskammer erfolgt der Austausch von 50 mM K^+ in der externen Lösung durch 50 mM Na^+ (Abbildung 3.11 B). Es ist eine deutliche Reduktion des Einstroms nach Austausch von K^+ gegen Na^+ zu erkennen. In der exemplarischen Strom-Spannungskurve zeigt sich bei -100 mV, in einer externen Lösung von 50 mM K^+ , ein Einstrom von 1400 pA. Dieser reduziert sich bei gleichbleibender Spannung nach Austausch durch 50 mM Na^+ auf 15 pA (Abbildung 3.11 C). In einer externen Lösung mit 50 mM Na^+ ergibt sich bei -100 mV ein mittlerer Einstrom von $37,2 \pm 25,2$ pA ($n=21$). Im Vergleich dazu, liegt der Einstrom in einer externen Lösung mit 50 mM K^+ bei $862,2 \pm 554,7$ pA ($n=64$). Das Umkehrpotential verschiebt sich in der exemplarischen Messung nach Austausch von einer K^+ -Lösung durch eine Na^+ -Lösung in den negativen Spannungsbereich und liegt bei -87 mV. Im Mittel liegt das Umkehrpotential bei $-59,5 \pm 19,5$ mV ($n=21$).

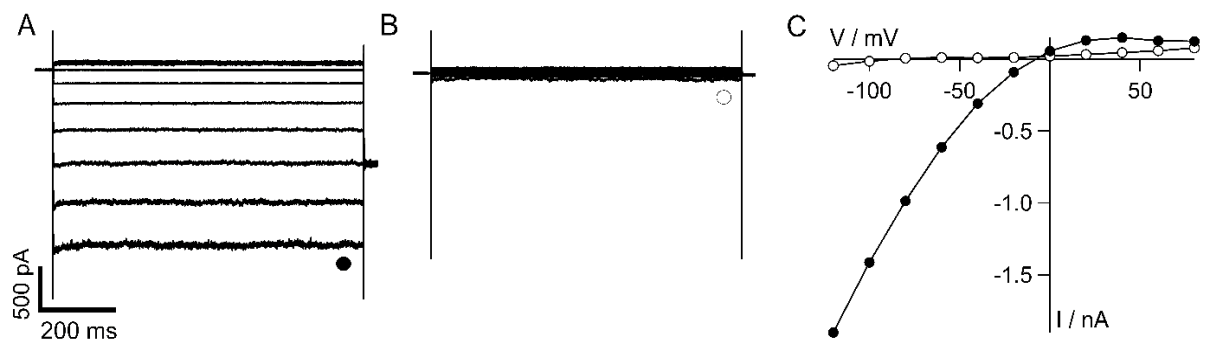


Abbildung 3.11: $Kmpv_{SP1}$ leitet kaum Na^+ . Stromantworten einer mit $Kmpv_{SP1}$:EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K^+ (A, geschlossene Kreise) und 50 mM Na^+ (B, offene Kreise) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mittels Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt.

Mit Hilfe von Gleichung 3.8 ergibt sich aus der Verschiebung der Umkehrspannung eine relative Permeabilität des Kanals für Na^+ zu K^+ von $0,20 \pm 0,13$ ($n=14$) (Hille, 2001).

3.2. Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ - Unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften, trotz ähnlicher Struktur

Kmpv₁ ist ein viraler K⁺-Kanal und stammt, wie Kmpv_{SP1}, aus einem Virus, welcher die Grünalge *Micromonas pusilla* befällt. Trotz der ähnlichen Aminosäure-Sequenzen der beiden viralen K⁺-Kanälen, zeigen sie ein unterschiedliches elektrophysiologisches Verhalten. Kmpv₁ leitet K⁺ wie ein ohmscher Widerstand; nach Expression in HEK293-Zellen zeigt er in *Patch-Clamp* Messungen sowohl bei positiv als auch negativ angelegten Haltespannungen einen Ein- und Ausstrom von K⁺ (Siotto *et al.*, 2014). Hingegen leitet Kmpv_{SP1} K⁺ vor allem bei negativ angelegten Haltespannungen und zeigt kaum Ausstrom bei positiven Haltespannungen. Wie schon mehrfach beschrieben handelt es sich bei diesem Kanal um einen Einwärtsgleichrichter. Die Aminosäure-Sequenzen beider Kanäle sind im Alignment in Abbildung 3.12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Aminosäure-Sequenzen vor allem im Bereich der Porenregion sehr konserviert sind. Aber auch im Bereich der TMs, welche mit dem Strukturvorhersageprogramm Jpred 4 berechnet wurden, sind sie im Wesentlichen ähnlich.

Kmpv ₁	M---KTVLNILIIITTLYGLLYSKMKPEHFNFKSPLDPFYFSFT	40
Kmpv _{SP1}	MTPIDKFKLIVIVALLYGFIYSRMDPEEFGFSSPLDPYYFSFT	43
	* *:*: : ***: : **:* . ** . * . *****:*****	
Kmpv ₁	TMSSVGYGDFSPKTDAAKLVMSQHLMIGELAKIL--KIF--	79
Kmpv _{SP1}	TMSSVGYGDSSPKTDRAKLLVMTQQVFIFGEILKLLMFKRKSK	86
	***** ***** ***:***:***: : . : : ** : * : * *	

Abbildung 3.12: Alignment der Aminosäure-Sequenzen je einer Untereinheit der viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁. Der Selektivitätsfilter ist in grün und die TMs sind in grau hinterlegt. Sterne markieren gleiche, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

Im nächsten Abschnitt wurden Mutationsstudien durchgeführt, um herauszufinden welche Strukturelemente von Kmpv_{SP1} gegenüber Kmpv₁ für die unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften verantwortlich sind.

3.2.1. Sensitivität für Ba²⁺

Ba²⁺ ist, wie bereits beschrieben, ein typischer K⁺-Kanalblocker. Die Stärke und Kinetik des Blocks ist stark spannungs- und konzentrationsabhängig (Standen und Stanfield, 1978; Armstrong und Taylor, 1980). In Kapitel 3.1.1 wurde der virale K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} auf seine Sensitivität für Ba²⁺-Ionen untersucht. Die Ergebnisse der Patch-Clamp Messungen zeigen, dass

Kmpv_{SP1} sehr sensitiv für Ba²⁺ ist. Bei -100 mV wird der Einstrom bereits in Anwesenheit von 1 mM Ba²⁺ in der externen Lösung fast vollständig blockiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden viralen K⁺-Kanälen Kmpv_{SP1} und Kmpv₁, die vor allem in der kritischen Region des Selektivitätsfilters sehr hoch ist (Abbildung 3.12), ist zu vermuten, dass Kmpv₁ eine ähnliche Sensitivität für Ba²⁺-Ionen aufweist. In vorangegangenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass Kmpv_{SP1} wesentlich sensitiver für Ba²⁺ ist als Kmpv₁ (Siotto, 2017). Im folgenden Kapitel wird dies genauer untersucht.

Hierzu wurde Kmpv₁::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. Alle Stromantworten wurden mit dem gleichen Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Während der gesamten Versuchsreihe wurden die Standard-Lösungen verwendet. Nur die Ba²⁺-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Perfusionskammer in der externen Lösung zwischen 0 und 100 mM eingestellt. In Abbildung 3.13 A sind die exemplarischen Stromspuren einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle jeweils bei einer Kommandospannung von -100 mV in einer externen Konzentration an Ba²⁺ zwischen 0 und 1 mM dargestellt. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 3.13 B die exemplarischen Stromspuren einer mit Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle jeweils bei einer Kommandospannung von -100 mV und einer Ba²⁺-Konzentration zwischen 0 und 10 mM veranschaulicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Einstrom von Kmpv₁ bei gleicher Ba²⁺-Konzentration wesentlich geringer inhibiert wird, als der Einstrom von Kmpv_{SP1}. Dies wird nach Auftragung des relativen Blocks gegenüber der Ba²⁺-Konzentration bei einer Referenzspannung von -100 mV in Abbildung 3.13 C verdeutlicht. Durch Erhöhung der Ba²⁺-Konzentration ist in beiden Fällen ein erhöhter Block des Einstroms zu verzeichnen. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde bei Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ mit der Hill-Gleichung (Gleichung 3.6) gefittet. Mit einem Hill-Faktor von 1 lassen sich die Datenpunkte in beiden Fällen am besten beschreiben. Die sigmoidale Kurve für Kmpv₁ ist im Vergleich zu Kmpv_{SP1} nach rechts verschoben; für Kmpv₁ sind höhere Ba²⁺-Konzentrationen nötig, um den gleichen Block des Einstromes, wie bei Kmpv_{SP1}, zu erhalten. So liegt der K_D-Wert bei Kmpv_{SP1} bei einer Referenzspannung von -100 mV bei 13 μM, hingegen liegt er bei Kmpv₁ mit 945 μM fast zwei Größenordnungen höher. Die ermittelten K_D-Werte wurden als Funktion der Spannung über einen Bereich von -20 bis -120 mV aufgetragen (Abbildung 3.13 D). Durch Fitten der aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten K_D-Werte mit Gleichung 3.7 ergibt sich für λ ein Wert von 0,5. Für Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ ist eine deutliche Spannungsabhängigkeit zu erkennen. Die halbmaximale Inhibierung nimmt mit zunehmender Spannung ab. Das bedeutet, dass mit negativeren Spannungen eine geringere Ba²⁺-Konzentration nötig ist, um den halbmaximalen Block zu erreichen. Auch die Inhibierung von Kmpv₁ ist spannungsabhängig,

nur ist der Kurvenverlauf von $Kmpv_1$ im Vergleich zu $Kmpv_{SP1}$ jedoch zu höheren Werten verschoben; für $Kmpv_1$ sind deutlich höhere Ba^{2+} -Konzentrationen notwendig, um die gleiche halbmaximale Inhibierung, wie bei $Kmpv_{SP1}$, zu erreichen.

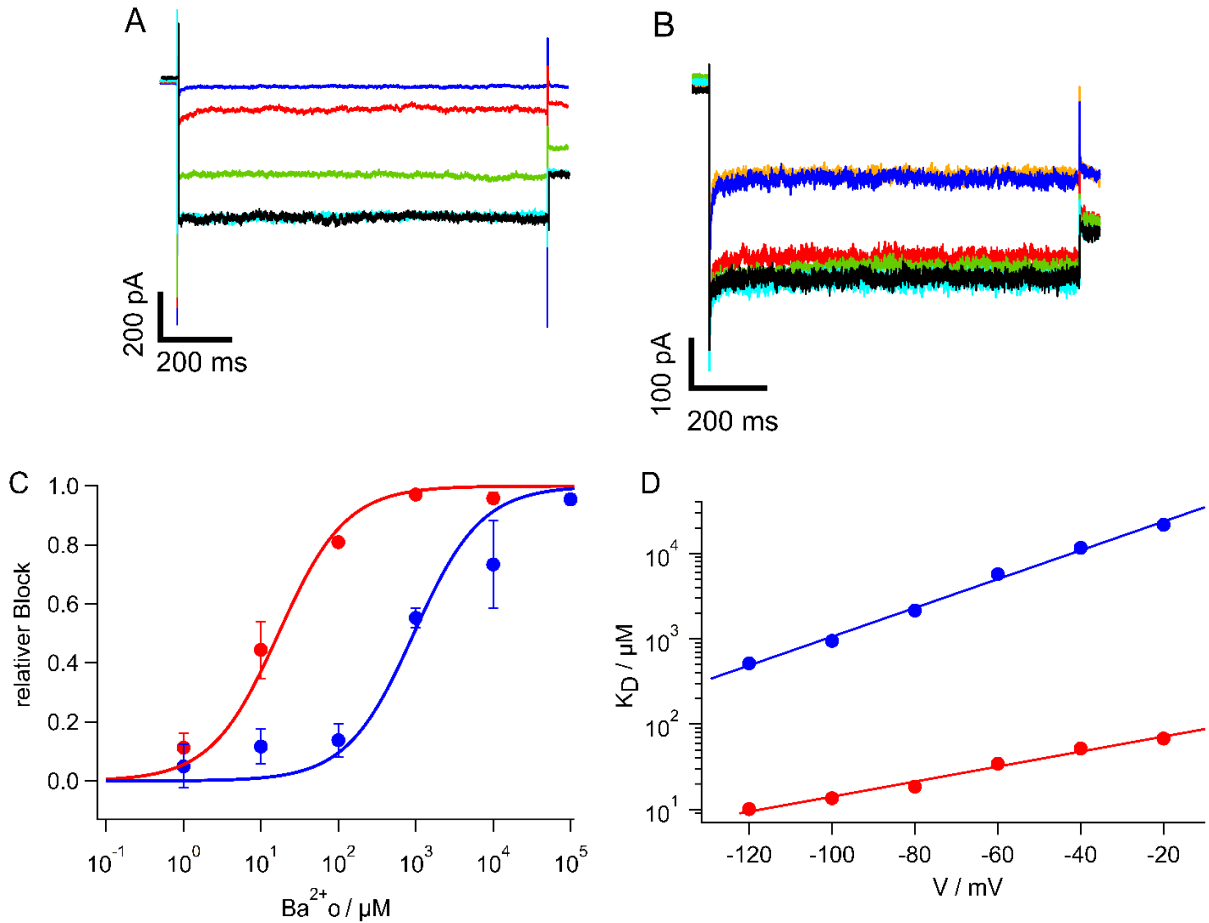


Abbildung 3.13: $Kmpv_{SP1}$ zeigt eine höhere Ba^{2+} - Sensitivität als $Kmpv_1$. A Stromantworten einer mit $Kmpv_{SP1}::EGFP$ transfizierten HEK293-Zelle bei einer exemplarischen Haltespannung von -100 mV in einer externen Lösung von 50 mM K^+ in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit von Ba^{2+} (1 μM = türkis, 10 μM = grün, 100 μM = rot, 1 mM = blau). B Stromantworten einer mit $Kmpv_1::EGFP$ transfizierten HEK293-Zelle bei einer Haltespannung von -100 mV in einer externen Lösung von 50 mM K^+ in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit von Ba^{2+} (1 μM = türkis, 10 μM = grün, 100 μM = rot, 1 mM = blau, 10 mM = orange). Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. C zeigt den relativen Block bei einer Haltespannung von -100 mV gegen die Ba^{2+} -Konzentration. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert mit Standardabweichung ($Kmpv_{SP1}$ = rot; 1 μM , 100 μM , 1 mM n=3; 10 μM n=5; 10 mM n=6), ($Kmpv_1$ = blau; 1 μM n=6; 10 μM , 10 mM n=7; 100 μM n=5; 1 mM n=4; 10 mM n=6; 100 mM n=3). Die Messdaten wurden mit der Hill-Gleichung (Gleichung 3.6) gefittet. D stellt die aufgetragenen K_D -Werte gegen die Spannungen in einem Bereich von -120 bis -20 mV dar. Die Messdaten wurden mit der Woodhull-Gleichung (Gleichung 3.7) gefittet.

Die Ergebnisse zeigen, nicht wie zunächst erwartet, dass Kmpv_{SP1} deutlich sensitiver für die typischen K⁺-Kanalblocker Ba²⁺ ist als Kmpv₁. Aufgrund der gleichen Versuchsbedingungen müssen inhärente Faktoren für die unterschiedliche Sensitivität für Ba²⁺ verantwortlich sein. Da die Ba²⁺-Sensitivität von K⁺-Kanälen im Selektivitätsfilter entschieden wird (Chatelain *et al.*, 2009), muss angenommen werden, dass die Feinstruktur dieser Domäne in beiden Kanälen, trotz sehr ähnlicher Primärsequenz, unterschiedlich ist.

Um zu untersuchen, welcher inhärente Faktor für die unterschiedliche Ba²⁺-Sensitivität verantwortlich ist, wurde die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ bestehend aus der ersten und zweiten TM des Kmpv_{SP1} und der Porenregion des Kmpv₁ hergestellt. Die Aminosäure-Sequenz der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ ist im Anhang in Abbildung 9.1 dargestellt. So kann untersucht werden, ob die TMs oder die Porenregion für die unterschiedliche Sensitivität verantwortlich sind. Sollte z.B. die Porenregion des Kmpv_{SP1} für die hohe Sensitivität verantwortlich sein, dann müsste die Chimäre in folgendem Versuchsablauf, eine niedrige Sensitivität für Ba²⁺ aufweisen. Sind allerdings die TMs für das elektrophysiologische Verhalten verantwortlich, würde die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ eine hohe Sensitivität für Ba²⁺ zeigen.

Die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ wurde mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration, wie in Abbildung 3.13 untersucht. Die exemplarischen Stromspuren, einer mit der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle bei einer Haltespannung von -100 mV, sind in Abbildung 3.14 A dargestellt. In diesem Experiment wurde die externe Ba²⁺-Konzentration schrittweise von 0 auf 10 mM erhöht. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Ba²⁺-Konzentration von 10 μ M (grün) nicht ausreicht, um den Einstrom gegenüber der Kontrolle (0 mM Ba²⁺) zu blockieren. Erst bei einer Ba²⁺-Konzentration von 1 mM ist ein deutlicher Block des Einwärtsstroms von ungefähr 50% zu erkennen. Die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ verhält sich demnach in ihrer Sensitivität für Ba²⁺ wie Kmpv₁. Der inhärente Faktor, welcher für die Ba²⁺-Sensitivität verantwortlich ist, muss demnach innerhalb der Porenregion liegen, da diese vom Kmpv₁ stammt. Um die Sensitivitäten der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ mit der von Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ zu vergleichen, wurde der relative Block gegen die Ba²⁺-Konzentration bei einer Referenzspannung von -100 mV aufgetragen (Abbildung 3.14 B). Die Messpunkte wurden mit der Hill-Gleichung gefittet (Gleichung 3.6). Der beste Fit ergibt sich wiederum für einen Hill-Faktor von 1. Der Verlauf der sigmoidalen Kurve der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ verschiebt sich, im Vergleich zu Kmpv_{SP1}, zu höheren Konzentrationen und liegt annähernd im Bereich des Kurvenverlaufs des Kmpv₁. Allerdings liegt der K_D-Wert mit 2,2 mM noch deutlich höher als bei Kmpv₁. In Abbildung 3.14 D wurden die K_D-Werte gegen einen Spannungsbereich von -120 bis

-20 mV aufgetragen. Die Messpunkte wurden mit der Woodhull-Gleichung (Gleichung 3.7) gefittet. Hieraus ergibt sich für die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ ein Wert für λ von 0,35. Auch im Falle der Chimäre ist eine Spannungsabhängigkeit zu erkennen; mit zunehmend negativen Haltespannungen sinkt der K_D -Wert. Im Vergleich zu Kmpv_{SP1} ist eine deutliche Verschiebung zu höheren K_D -Werten zu verzeichnen, die Gerade liegt annähernd bei der von Kmpv₁.

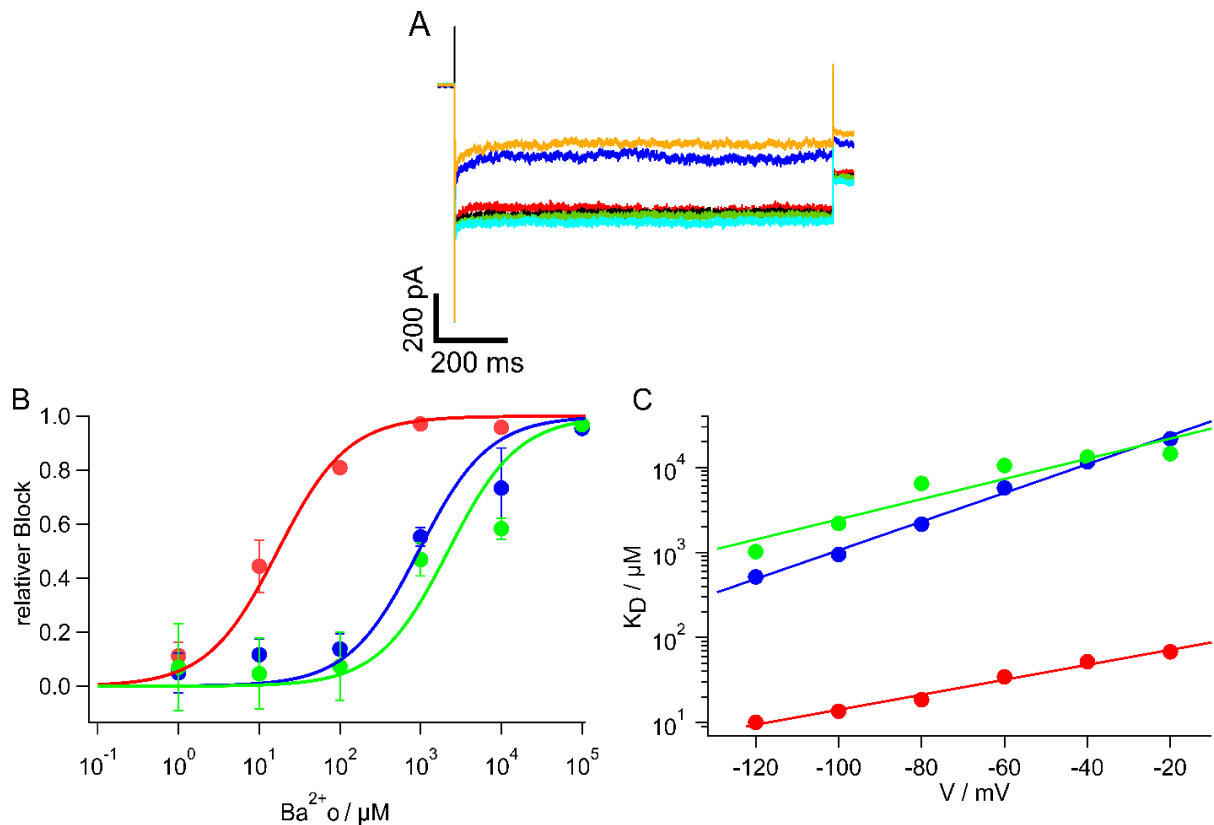


Abbildung 3.14: Die Porenregion ist verantwortlich für die hohe Ba^{2+} -Sensitivität A Stromantworten einer mit der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle bei einer Haltespannung von -100 mV in einer externen Lösung von 50 mM K^+ in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit von Ba^{2+} (1 μM = türkis, 10 μM = grün, 100 μM = rot, 1 mM = blau, 10 mM = orang). Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. B zeigt den relative Block bei einer Haltespannung von -100 mV gegen die Ba^{2+} -Konzentration. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert mit Standardabweichung (Kmpv_{SP1}=rot; 1 μM , 100 μM , 1 mM n=3; 10 μM n=5; 10 mM n=6), (Kmpv₁ = blau; 1 μM n=6; 10 μM , 10 mM n=7; 100 μM n=5; 1 mM n=4; 10 mM n=6; 100 mM n=3), (Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ =grün; 1 μM , 10 μM , 1 mM, 100 mM n=4; 100 μM n=3, 10 mM n=11). Die Messdaten wurden mit der Hill-Gleichung (Gleichung 3.6) gefittet. C stellt die aufgetragenen K_D -Werte gegen die Spannungen in einem Bereich von -120 bis -20 mV dar. Die Messdaten wurden mit der Woodhull-Gleichung (Gleichung 3.7) gefittet.

Spannungen abnimmt. Im Vergleich zu Kmpv_{SP1} ist für die Mutante eine deutliche Verschiebung zu höheren K_D -Werten zu erkennen; die Gerade liegt annähernd bei der von Kmpv₁. Die K_D -Werte für beide Konstrukte sind bei -100 mV mit 928 μ M für Kmpv_{SP1} S53F und 945 μ M für Kmpv₁ nahezu identisch.

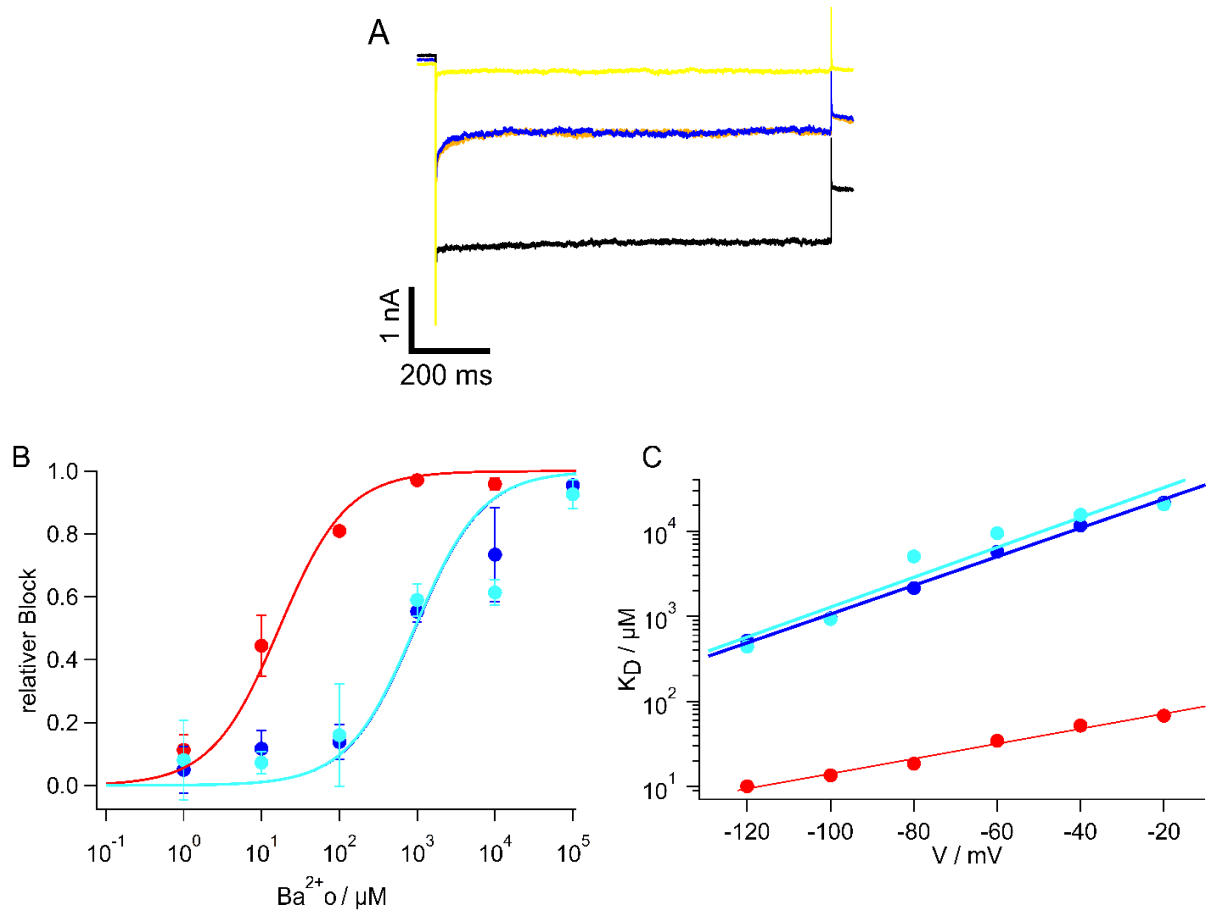


Abbildung 3.16: Die Aminosäure Serin hinter dem GYG-Motiv ist verantwortlich für die hohe Ba²⁺-Sensitivität. A Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1} S53F::EGFP transfizierten HEK293-Zelle bei einer Haltespannung von -100 mV in einer externen Lösung von 50 mM K⁺ in Abwesenheit (schwarze) und Anwesenheit von Ba²⁺ (1 mM = blau, 10 mM = orange, 100 mM = gelb). Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. B zeigt den relative Block bei einer Haltespannung von -100 mV gegen die Ba²⁺-Konzentration. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert mit Standardabweichung (Kmpv_{SP1}=rot; 1 μ M, 100 μ M, 1 mM n=3; 10 μ M n=5; 10 mM n=6), (Kmpv₁ = blau; 1 μ M n=6; 10 μ M, 10 mM n=7; 100 μ M n=5; 1 mM n=4; 10 mM n=6; 100 mM n=3), (Kmpv_{SP1} S53F =grün; 1 μ M, 100 μ M n=3; 10 μ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM n=4). Die Messdaten wurden mit der Hill-Gleichung (Gleichung 3.6) gefittet. C stellen die aufgetragenen K_D -Werte gegen die Spannungen in einem Bereich von -120 bis -20 mV dar. Die Messdaten wurden mit der Woodhull-Gleichung (Gleichung 3.7) gefittet.

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass die Aminosäure Serin in dem K⁺-Kanal Kmpv_{SP1}, welches zwei Aminosäuren hinter dem GYG-Motiv liegt, eine zentrale Rolle in der

Ba²⁺-Sensitivität spielt. Durch den Austausch von Serin zu Phenylalanin verliert Kmpv_{SP1} seine hohe Sensitivität für Ba²⁺. So ist für die halbmaximale Inhibierung bei -100 mV für Kmpv_{SP1} nur eine Ba²⁺-Konzentration von 14 μ M nötig, hingegen benötigt man für Kmpv_{SP1} S53F eine 67-fach höhere Ba²⁺-Konzentration.

3.2.2. Die Transmembran-Helices sind verantwortlich für die hohe Cs⁺-Sensitivität des Kmpv_{SP1}

In vorherigem Kapitel 6.1.1 konnte gezeigt werden, dass sich die Ba²⁺-Sensitivität der beiden viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ stark unterscheidet und dass die Aminosäure Serin an der Stelle 53 in Kmpv_{SP1} hierfür verantwortlich ist. In den nachfolgenden Versuchen wurde die Cs⁺-Sensitivität untersucht. Es soll überprüft werden, ob ein K⁺-Kanal sensibler für Cs⁺ ist als der andere.

Im ersten Teil der Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sich der Einstrom des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} durch 10 mM Cs⁺ in der externen Lösung im Mittel um $78 \pm 3\%$ (n=6) blockieren lässt (Abbildung 3.9). Um die Cs⁺-Sensitivität des viralen K⁺-Kanals Kmpv₁ zu untersuchen, wurde Kmpv₁::EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration, wie in Abbildung 3.9, gemessen. Die Cs⁺-Konzentration wurde mit Hilfe der Perfusionskammer von 0 auf 5 und 10 mM in der externen Lösung erhöht. In Abbildung 3.17 A ist eine repräsentative Stromantwort in Abwesenheit von Cs⁺ dargestellt. Bei einer Referenzspannung von -100 mV ist ein Einstrom von 600 pA zu erkennen. Nach Zugabe von 5 mM Cs⁺ in die externe Lösung wird der Einstrom bei einer Referenzspannung von -100 mV um nur 7% blockiert (Abbildung 3.17 B). Erst bei einer Cs⁺-Konzentration von 10 mM zeigt sich eine deutlichere Blockierung des Einstroms bei -100 mV um 36%. Die stationären Ströme wurden in einer Strom-Spannungskurve in Abbildung 3.17 D aufgetragen.

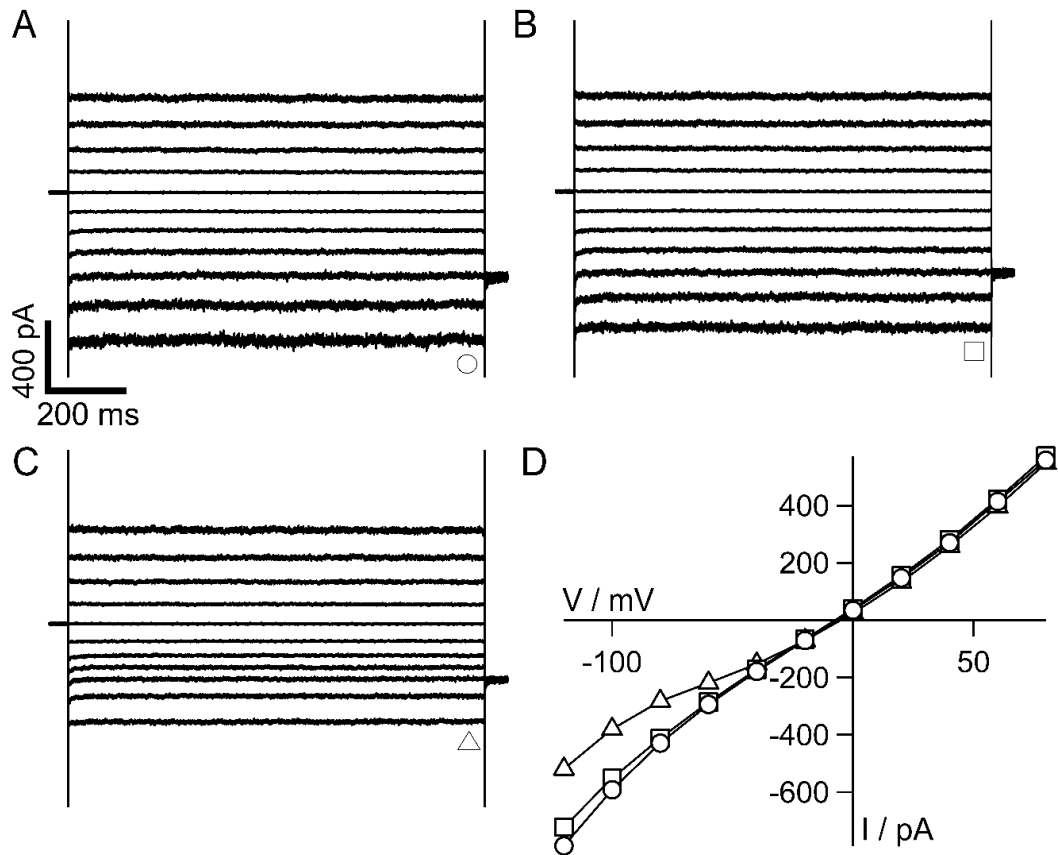


Abbildung 3.17: Kmpv₁ zeigt keine hohe Sensitivität für Cs⁺. Stromantworten einer mit Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K⁺ in Abwesenheit von Cs⁺ (A, Kreise) und Anwesenheit von 5 mM Cs⁺ (B, Vierecke) und 10 mM Cs⁺ (C, Dreiecke) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.9, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in D wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A,B und C) dargestellt.

Der virale K⁺-Kanal Kmpv₁ zeigt eine viel geringere Sensitivität für Cs⁺ als Kmpv_{SP1}. Um die Sensitivität der beiden K⁺-Kanäle Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} zu vergleichen, wurde der relative Block bei einer Cs⁺-Konzentration von 10 mM und einer Haltespannung von -100 mV aufgetragen (Abbildung 3.18). Hier wird nochmals deutlich, dass der Block bei Kmpv_{SP1} bei gleicher Cs⁺-Konzentration deutlich höher liegt als bei Kmpv₁. Kmpv_{SP1} zeigt einen relativen Cs⁺-Block von $0,78 \pm 0,03$ (n=6), während Kmpv₁ unter den gleichen Bedingungen nur einen relativen Cs⁺-Block von $0,32 \pm 0,07$ (n=10) aufweist.

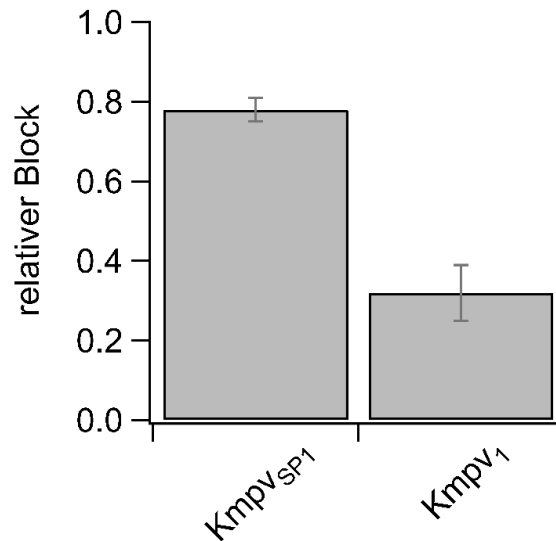


Abbildung 3.18: Kmpv_{SP1} ist 2,4-mal sensitiver für Cs⁺ als Kmpv₁. Dargestellt ist der mittlere relative Block mit Standardabweichung von Kmpv_{SP1} (n=6) und Kmpv₁ (n=10) bei einer Referenzspannung von -100 mV in Anwesenheit von 10 mM Cs⁺ in der externen Lösung mit Standardabweichung.

Um zu untersuchen, ob die Cs⁺-Sensitivität von der Porenregion oder den TMs abhängig ist, wurde die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ auch auf ihre Cs⁺-Sensitivität hin untersucht. Es wurden die Standardlösungen und das Standard-Pulsprotokoll verwendet. In Abbildung 3.19 A ist eine repräsentative Stromantwort einer HEK293-Zelle, welche die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁::EGFP exprimiert, in Abwesenheit von Cs⁺ dargestellt. Bei einer Referenzspannung von -100 mV zeigt sich ein Einstrom von 890 pA. Nach Zugabe von 1 mM Cs⁺ in die externe Lösung ist eine deutliche Reduktion des Einstroms auf 580 pA zu erkennen; die Reduktion beträgt 34% (Abbildung 3.19 B). Auffällig ist eine Spannungsabhängigkeit des Cs⁺-Blocks. Der Einstrom zeigt erst bei Testspannungen negativer als -60 mV eine deutliche Inhibierung durch Cs⁺. Nach Zugabe von 10 mM Cs⁺ reduziert sich der Einstrom bei einer Referenzspannung von -100 mV auf 170 pA und somit um 91% im Vergleich zur Cs⁺-freien Lösung (Abbildung 3.19 C). Auch hier ist wieder deutlich zu erkennen, dass der Einstrom erst bei Testspannungen negativer als -60 mV sichtbar abnimmt. Dies wird nochmals in der Strom-Spannungskurve verdeutlicht (Abbildung 3.19 D).

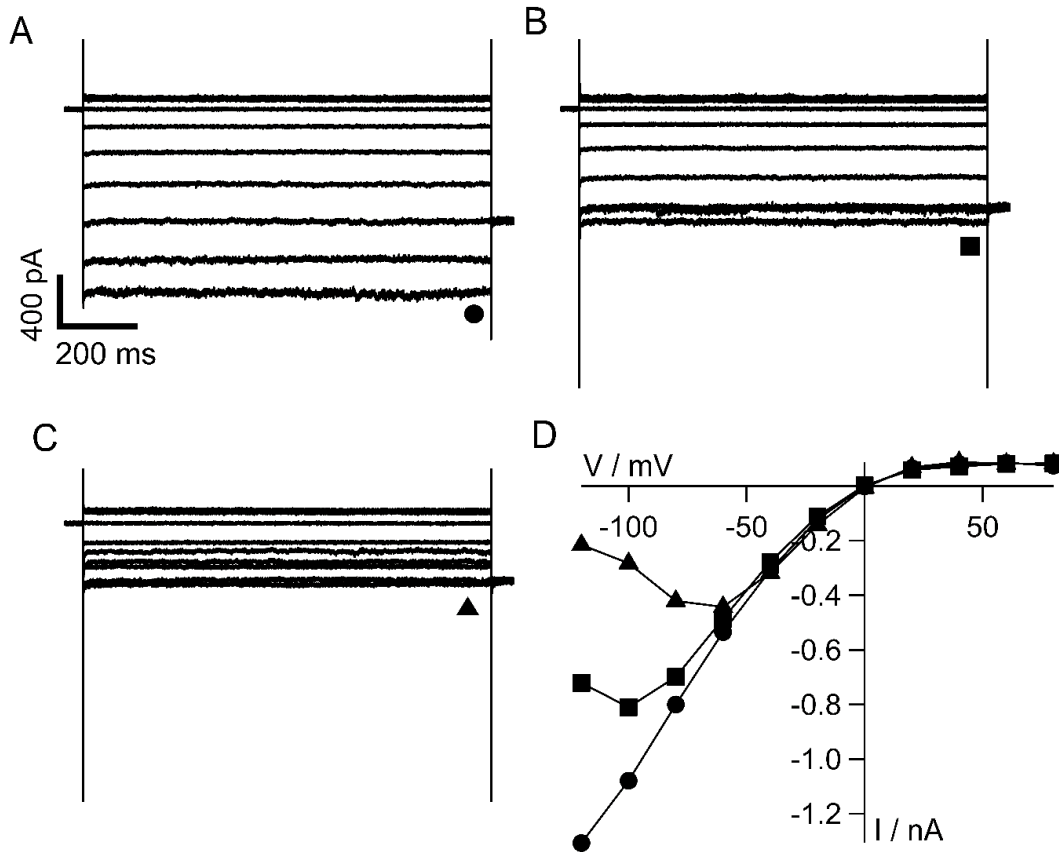


Abbildung 3.19: Die TMs des Kmpv_{SP1} sind für die hohe Cs⁺-Sensitivität verantwortlich. Stromantworten einer mit Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K⁺ in Abwesenheit von Cs⁺ (A, Kreise) und Anwesenheit von 5 mM Cs⁺ (B, Vierecke) und 10 mM Cs⁺ (C, Dreiecke) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in D wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A,B und C) dargestellt.

Um die Sensitivitäten der beiden Kanäle zu vergleichen, wurde wieder der jeweilige relative Cs⁺-Block bei einer externen-Lösung von 10 mM Cs⁺ bei einer Referenzspannung von -100 mV aufgetragen (Abbildung 3.20). Es wird deutlich, dass der relative Block der Chimäre mit $0,80 \pm 0,04$ (n=6) dem des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} entspricht. Dieser zeigt unter gleichen Bedingungen einen relativen Block von $0,78 \pm 0,03$ (n=6). Der relative Block von Kmpv₁ liegt mit $0,32 \pm 0,07$ (n=10) deutlich unter dem der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ und des Kmpv_{SP1}.

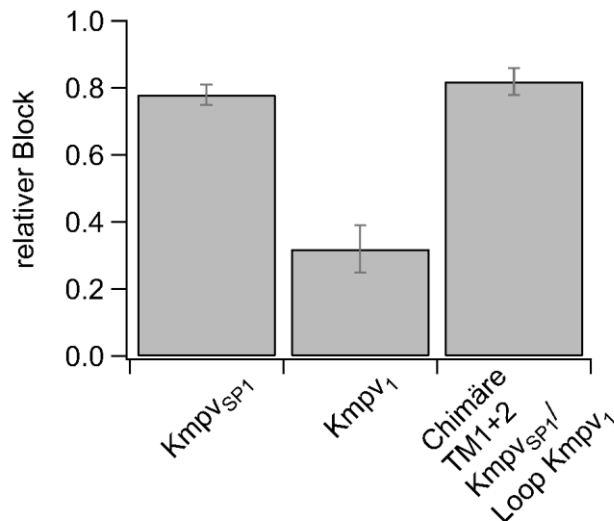


Abbildung 3.20: Die TMs sind verantwortlich für die hohe Cs⁺-Sensitivität. Dargestellt ist der mittlere relative Cs⁺-Block mit Standardabweichung von Kmpv_{SP1} (n=6), Kmpv₁ (n=10) und die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ (n=6) bei einer Referenzspannung von -100 mV in Anwesenheit von 10 mM Cs⁺.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht die Pore, sondern die TMs von Kmpv_{SP1} für die hohe Sensitivität für Cs⁺ verantwortlich sind. Dies ist bemerkenswert, da eigentlich angenommen wird, dass die Porenregion und somit der Selektivitätsfilter für den Durchtritt der Ionen maßgeblich verantwortlich ist (Bernèche und Roux, 2001). Eine Erklärung hierfür kann sein, dass es durch die strukturellen Veränderungen der TMs zu einer anderen Aufhängung des Selektivitätsfilters kommt und daraus die unterschiedliche Cs⁺-Sensitivität resultiert.

3.2.3. Die Transmembran-Helices sind verantwortlich für die unterschiedliche Rb⁺-Leitfähigkeit

Wie bereits in Kapitel 6.1.4 gezeigt werden konnte, leitet Kmpv_{SP1} Rb⁺ schlechter als K⁺. Im folgenden Kapitel soll die Leitfähigkeit des viralen K⁺-Kanals Kmpv₁ für Rb⁺ untersucht und anschließend mit der Rb⁺-Leitfähigkeit des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} verglichen werden.

Kmpv₁ wurde, wie in Abbildung 3.10 mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration in HEK293-Zellen gemessen. In Abbildung 3.21 A ist eine exemplarische Stromantwort einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in Standard-Lösungen dargestellt. Nach dem Austausch der externen Lösung mit einer 50 mM Rb⁺-Lösung, verringerte sich der Einstrom bei -100 mV um das 2,5-fache (Abbildung 3.21 B). Dies spiegelt sich in der Strom-Spannungskurve wieder (Abbildung 3.21 C). Deutlich zu erkennen ist, dass sich durch den Austausch von K⁺ gegen Rb⁺ in der externen Lösung auch das Umkehrpotential im Mittel

um $18,48 \pm 3,16$ mV ($n=9$) zu negativen Spannungen verschiebt. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 3.21 D eine repräsentative Stromantwort einer mit Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer 50 mM K⁺-Lösung (extern) und in Abbildung 3.21 E die Stromantwort der gleichen Zelle nach Austausch zu einer 50 mM Rb⁺-Lösung (extern) dargestellt. In der K⁺-Lösung beträgt der Einstrom bei -100 mV 600 pA, hingegen steigt er in 50 mM Rb⁺ bei gleicher Spannung auf 4 nA und somit um das 6,5-fache an. Die Strom-Spannungskurven der stationären Ströme aus D und E sind in F abgebildet. Das Umkehrpotential verschiebt sich beim Austausch der Lösungen weder in den positiven noch in den negativen Spannungsbereich, es bleibt bei beiden Lösungen bei -6,5 mV. Im Mittel liegt das Umkehrpotential in einer 50 mM K⁺-Lösung bei $-7,58 \pm 2,78$ mV ($n=55$) und in einer 50 mM Rb⁺-Lösung bei $-6,47 \pm 0,77$ mV ($n=10$). Aus der Verschiebung der Umkehrspannung ergibt sich eine relative Permeabilität des Kanals für Rb⁺ zu K⁺ von $1,06 \pm 0,11$ ($n=10$) (Gleichung 3.8).

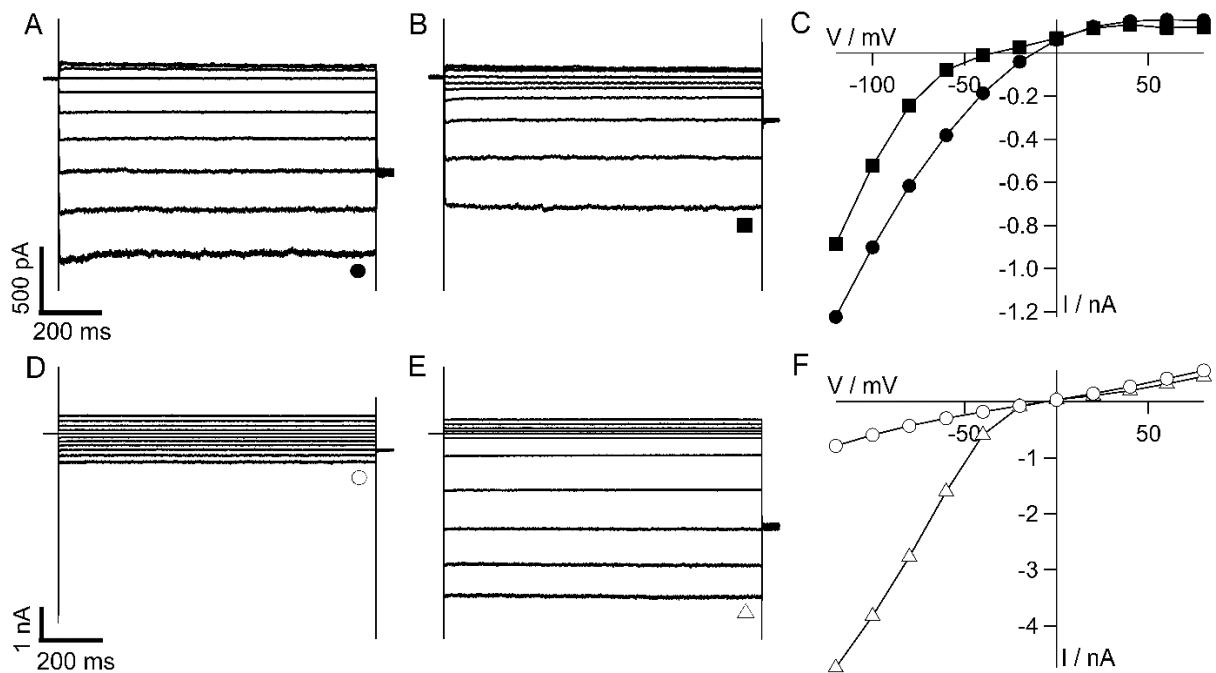


Abbildung 3.21: Kmpv₁ leitet Rb⁺ besser als Kmpv_{SP1}. Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K⁺ (A, geschlossene Kreise) und 50 mM Rb⁺ (B, geschlossene Vierecke) in der externen Lösung. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt. Stromantworten einer mit Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K⁺ (D, offene Kreise) und 50 mM Rb⁺ (E, offene Dreiecke) in der externen Lösung. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in F wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (D und E) dargestellt. Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen.

Die ungewöhnlich hohe Zunahme der Leitfähigkeit von Kmpv₁ in Rb⁺ soll im Weiteren mit der planaren Lipid-Bilayer Technik untersucht werden, um Einblicke in den Effekt von Rb⁺ auf die Einzelkanalcharakteristik zu erhalten. Dies ist mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration nicht möglich; in dieser Konfiguration können nur alle Kanäle in der gesamten Zellmembran gemessen werden, wodurch sich der Effekt der Kationen auf die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals und die Offenwahrscheinlichkeit nicht bestimmen lässt. Allerdings ist es wichtig zu erfahren, weshalb Kmpv₁ eine solch hohe Rb⁺-Leitfähigkeit im Vergleich zur K⁺-Leitfähigkeit zeigt.

In den folgenden Experimenten wurde Kmpv₁ nach Rekonstitution in einen planaren Lipid-Bilayer bei Haltespannungen von -160 bis +160 mV in 20 mV Schritten für 10 s gemessen. Zunächst wurde Kmpv₁ in einer symmetrischen Lösung mit 100 mM K⁺ und 10 mM HEPES (pH 7,0), als Referenz untersucht. Exemplarischen Stromspuren sind in Abbildung 3.22 A dargestellt. Hier zeigen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Spannungsbereich Schaltereignisse. Anschließend wurde Kmpv₁ in einer symmetrischen Lösung mit 100 mM Rb⁺ und 10 mM HEPES (pH 7,0) gemessen. Die dazugehörigen exemplarischen Stromspuren sind in Abbildung 3.22 B abgebildet. Auch hier sind in positiven, als auch in negativen Spannungsbereichen Schaltereignisse zu verzeichnen. Die mittleren Strom-Spannungskurven sind in Abbildung 3.22 C aufgetragen. Bei einer Referenzspannung von -100 mV zeigt Kmpv_{SP1} in einer 100 mM Rb⁺-Lösung eine 2,8-fach höhere mittlere Leitfähigkeit, als in einer 100 mM K⁺-Lösung. Die relative Offenwahrscheinlichkeit ist in Abbildung 3.22 D dargestellt. Im negativen Spannungsbereich ist diese in 100 mM K⁺ und 100 mM Rb⁺ fast identisch und weisen bei einer Referenzspannung von -120 mV eine Offenwahrscheinlichkeit von über 98% auf. Bei Spannungen positiver als 100 mV ist, die Offenwahrscheinlichkeit in einer 100 mM K⁺-Lösung etwas höher und liegt bei einer Referenzspannung von -120 mV bei 99 %, hingegen liegt sie in einer 100 mM Rb⁺-Lösung nur bei 78%. Zusammenfassend kann man sagen, dass die höhere Rb⁺-Leitfähigkeit von Kmpv₁ im Vergleich zu Kmpv_{SP1} auf die Einzelkanalleitfähigkeit zurückzuführen ist.

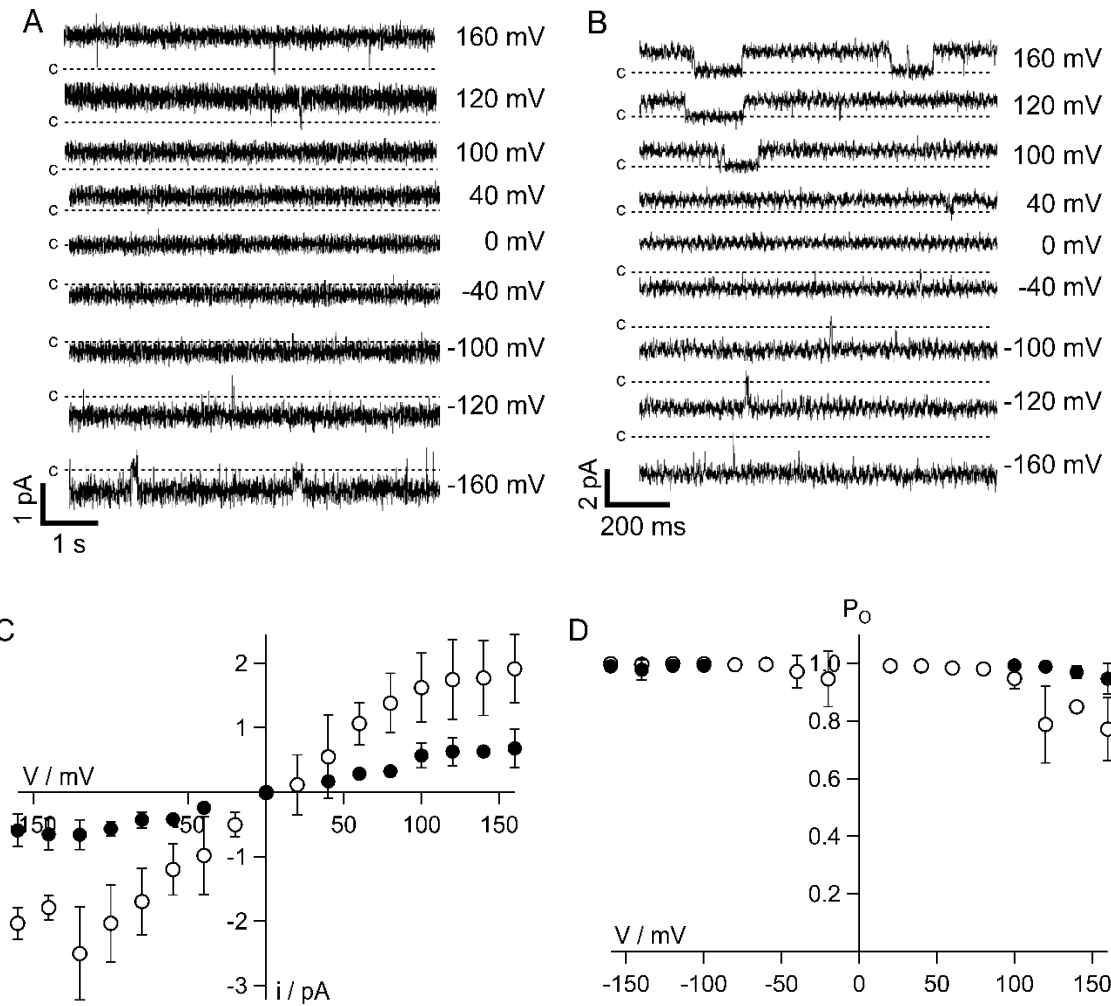


Abbildung 3.22: Kmpv₁ zeigt eine 2,8-fach höhere Leitfähigkeit für Rb⁺ im Vergleich zu K⁺. A zeigt repräsentative Stromspuren mit Einzelkanalfluktuationen des Kmpv₁ in symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung (pH 7,0) in DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen. Die Stromspuren wurden digital bei 100 Hz gefiltert. B zeigt repräsentative Stromspuren mit Einzelkanalfluktuationen des Kmpv₁ in symmetrischer 100 mM Rb⁺-Lösung (pH 7,0) in DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen. Die Stromspuren wurden digital bei 500 Hz gefiltert. C markiert den Geschlossenzustand. In C ist die Strom-Spannungskurven des zeitgemittelten Stroms der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt (100 mM K⁺, geschlossenen Kreise, n = 9; 100 mM Rb⁺, offenen Kreise, n = 6). D zeigt die Offenwahrscheinlichkeiten aufgetragen gegen die angelegte Haltespannung (100 mM K⁺, geschlossenen Kreise, n = 9; 100 mM Rb⁺, offenen Kreise, n = 6).

Um zu untersuchen, welche Struktur für die unterschiedliche Rb⁺-Leitfähigkeit der beiden viralen K⁺-Kanäle Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} verantwortlich ist, wurde die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁ untersucht. Alle Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, generiert. In Abbildung 3.23 A ist zunächst eine repräsentative Stromantwort einer mit Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/Loop Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in

Standard-Lösungen dargestellt. Bei einer Referenzspannung von -100 mV ist ein Einstrom von 830 pA zu erkennen. Nach Austausch der externen Lösung mit Hilfe der Perfusionskammer durch 50 mM Rb^+ liegt der Einstrom bei gleicher Spannung nur noch bei 280 pA. Die stationären Ströme wurden gegen die jeweils angelegten Haltespannungen in einer Strom-Spannungskurve aufgetragen (Abbildung 3.23 C). Hier ist deutlich zu sehen, dass sich das Umkehrpotential nach Austausch der externen Lösung von K^+ zu Rb^+ in den negativen Spannungsbereich verschiebt. So liegt das Umkehrpotential in einer 50 mM K^+ -Lösung bei -4,8 mV und nach Austausch zu 50 mM Rb^+ -Lösung bei -30,1 mV. Dies steht im Einklang mit der Konstant-Feldtheorie; die Chimäre verhält sich so wie Kmpv_{SP1} beim dem ein Austausch von K^+ durch Rb^+ ebenfalls zur Verschiebung der Umkehrspannung geführt hat (Hille, 2001). Im Mittel verschiebt sich das Umkehrpotential um $21,58 \pm 10,66$ mV zu negativen Spannungen, nach Austausch der externen K^+ -Lösung durch Rb^+ ($n=6$). Aus der Verschiebung der Umkehrspannung ergibt sich eine relative Permeabilität des Kanals für Rb^+ zu K^+ von $0,4 \pm 0,05$ ($n=6$) (Gleichung 3.8). Die relative Permeabilität liegt somit nahe bei der des Wildtyp-Kanals Kmpv_{SP1} .

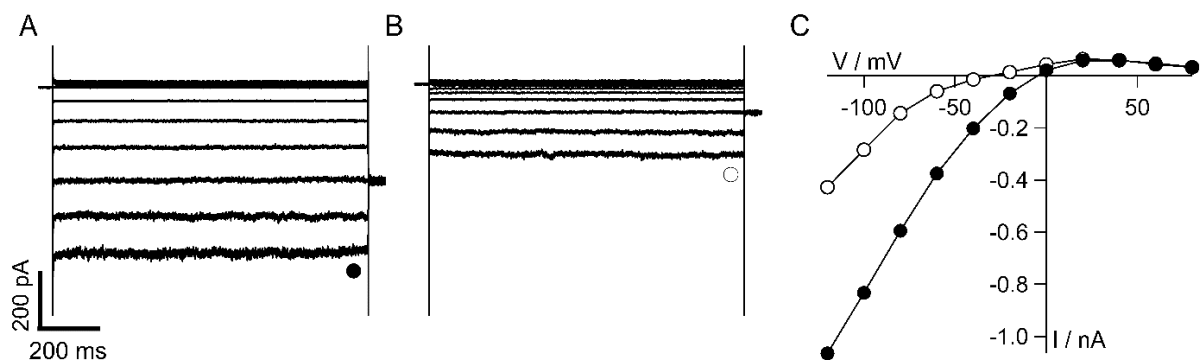


Abbildung 3.23: Die TMs sind verantwortlich für die geringe Rb^+ -Leitfähigkeit des Kmpv_{SP1} . Stromantworten einer mit Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1} / Loop $\text{Kmpv}_1::\text{EGFP}$ transfizierten HEK293-Zelle in 50 mM K^+ (A, geschlossene Kreise) und 50 mM Rb^+ (B, offene Kreise) in der externen Lösung. Die Stromantworten wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die geringe Rb^+ -Leitfähigkeit in Kmpv_{SP1} auf die TMs zurückzuführen ist. Obwohl bisher die Leitfähigkeit der Ionen durch die engste Stelle im K^+ -Kanal, den Selektivitätsfilter, bestimmt wird (Sansom *et al.*, 2002), scheint die Porenregion keinen Einfluss auf die Rb^+ -Leitfähigkeit zu nehmen, da diese in der untersuchten Chimäre vom Kmpv_1 stammt.

3.3. Bestimmung des inhärenten Faktors des intrinsischen Einwärtsgleichrichters Kmpv_{SP1}

Im letzten Teil der Ergebnisse wird die Einwärtsgleichrichtung des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} näher betrachtet. In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass die Einwärtsgleichrichtung nicht, wie bei den Kir-Kanälen, auf zweiwertige Kationen, wie z.B. Mg²⁺ zurückzuführen ist (Lopatin *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1987; Fakler *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995). Selbst in einer reinen K⁺-Lösung zeigt Kmpv_{SP1} im planaren Lipid-Bilayer eine Einwärtsgleichrichtung, welche nach Zugabe von EDTA, um zweiwertige Kationen zu komplexieren, erhalten bleibt. In weiteren Versuchen konnte auch HEPES als Ursache für die Gleichrichtung ausgeschlossen werden (Guo und Lu, 2000). Die Einwärtsgleichrichtung ist demnach auf inhärente Eigenschaften des Kanalproteins zurückzuführen.

Für die folgenden Untersuchungen wurde als Referenz zum Kmpv_{SP1} der virale K⁺-Kanal Kmpv₁ verwendet. Die beiden K⁺-Kanäle weisen sehr ähnliche Aminosäure-Sequenzen auf, wobei sie dennoch ein völlig unterschiedliches elektrophysiologisches Verhalten zeigen: Kmpv₁ leitet den Strom wie ein ohmscher Widerstand und somit im positiven wie auch im negativen Spannungsbereich (Abbildung 3.24 B und C). Kmpv_{SP1} hingegen leitet vor allem bei negativen Haltespannungen und verhält sich damit wie ein Einwärtsgleichrichter (Abbildung 3.24 A und C).

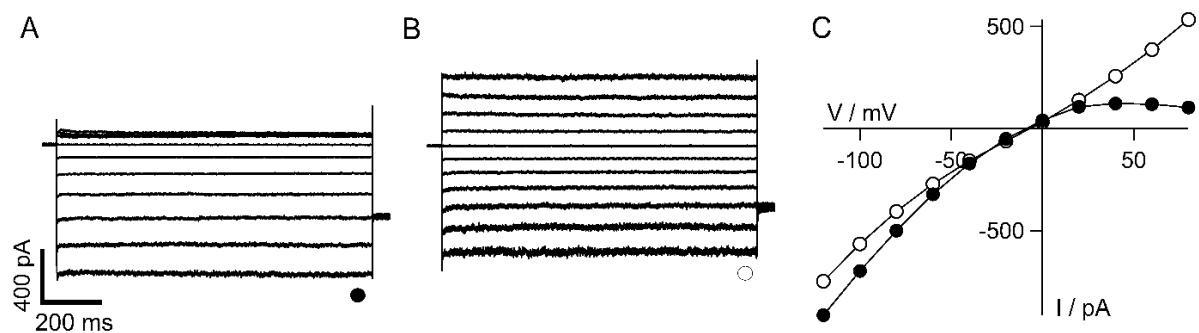


Abbildung 3.24: Kmpv_{SP1} ist ein inhärenter Einwärtsgleichrichter. Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1}::EGFP (A, geschlossenen Kreise) bzw. mit Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle (B, offenen Kreise) jeweils in Standard-Lösungen. Die Stromantworten wurden mittels Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1 aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt.

In Abbildung 3.25 ist, wie bereits in Abbildung 3.12, das Alignment der Aminosäure-Sequenz für die K⁺-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ dargestellt. Hier wird nochmals deutlich, dass die beiden viralen K⁺-Kanäle gerade in der Porenregion nahezu identisch sind. Das Konsensus-Motiv von K⁺-Kanälen ist mit einem grünen Kasten hinterlegt. Die TMs, welche mit dem Jpred4

Algorithmus vorhergesagt wurden, sind grau hinterlegt und weisen ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit auf.

Kmpv ₁	M---KTVLNILIIITTLYGLLYSKMKPEHFNFKSPLDPFYFSFT	40
Kmpv _{SP1}	MTPIDKFKLIVIVALLYGFIYSRMDPEEFGFSSPLDPYYFSFT	43
	* *:*: : ***:*:*:*.*.*.*****:*****	
Kmpv ₁	TMSSVGYGDFSPKTDAAKLVVMSQHLVMIGELAKIL--KIF--	79
Kmpv _{SP1}	TMSSVGYGDSPPKTDRAKLLVMTQQVFIFGEILKLLMFKRKSK	86
	***** ***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*	

Abbildung 3.25: Alignment der Aminosäure-Sequenzen je Untereinheit der viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁. Der Selektivitätsfilter ist in grün und die TMs sind in grau hinterlegt. Sterne markieren gleiche, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

Die Porenregion konnte als inhärenter Faktor für die Einwärtsgleichrichtung durch vorherige Studien ausgeschlossen werden (Siotto, 2017). Die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ zeigt in *whole-cell* Messungen eine deutliche Einwärtsgleichrichtung in Standard-Lösungen (Abbildung 3.26).

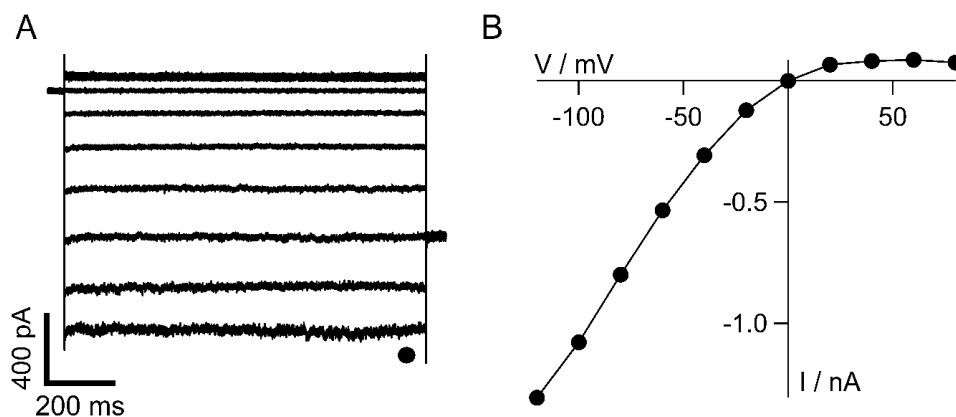


Abbildung 3.26: Die TMs sind verantwortlich für die Einwärtsgleichrichtung. Stromantworten einer mit Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle (A, geschlossenen Kreise). Die Stromantwort wurde mit dem Standard-Pulsprotokoll und in den Standard-Lösungen, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörige Strom-Spannungskurve in B wurde aus den stationären Strömen aus A dargestellt.

Um die Einwärtsgleichrichtung im Vergleich zu einer symmetrischen Leitfähigkeit zu quantifizieren, wurde der Rektifizierungs-Index (RI) nach Ozawa (1991) bestimmt. Dieser Ansatz lässt eine eindeutige Differenzierung zwischen einer symmetrischen Leitfähigkeit und

gleichrichtenden Leitfähigkeit zu. In Anlehnung an Ozawa (1991) wurde der RI mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Rektifizierungs-Index (RI)} = [I_{40}/(40\text{mV} - E_{\text{Rev}})]/[I_{-60}/(-60\text{mV} - E_{\text{Rev}})] \quad (\text{Gleichung 3.9})$$

I_{40} ist dabei der Strom bei einer Haltespannung von 40 mV, I_{-60} ist der Strom bei einer Haltespannung von -60 mV und E_{Rev} stellt das Umkehrpotential dar.

Hieraus ergibt sich für Kmpv_{SP1} ein RI von $0,40 \pm 0,17$ (n = 64), hingegen liegt der RI für Kmpv₁ mit $1,16 \pm 0,21$ (n = 55) deutlich höher. Die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ zeigt mit $0,31 \pm 0,14$ (n=38) einen ähnlichen RI wie der des Wildtyp-Kanal Kmpv_{SP1}.

In folgendem Kapitel wurden zunächst Punktmutationen mit Hilfe der Mutagenese-PCR hergestellt, um die Struktur im Kanalprotein, welche für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist, zu identifizieren. Die Mutanten wurden mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik und teilweise mit der planaren Lipid-Bilayer Technik untersucht. Außerdem wurden für eine nähere Eingrenzung weitere Chimären hergestellt und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik untersucht.

3.3.1. Strukturuntersuchungen des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} durch Punktmutationen

Um die Punktmutationen, ausgehend von Kmpv_{SP1} bestmöglich auszuwählen und anschließend elektrophysiologisch zu untersuchen, wurde neben Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} ein weiterer viraler K⁺-Kanal als Referenz untersucht. Kmpv_{PL1} (K⁺ *Micromonas pusilla virus PL1*), welcher ein Isolat des *Micromonas pusilla virus PL1* ist, besteht aus 85 Aminosäuren und ist nur eine Aminosäure kürzer als Kmpv_{SP1}. Dennoch zeigt er eine noch ähnlichere Aminosäure-Sequenz zu Kmpv_{SP1} als Kmpv₁. Im Alignment der beiden viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{PL1} und Kmpv_{SP1} wird deutlich, dass Kmpv_{PL1} im Vergleich zu Kmpv_{SP1} von 85 Aminosäuren nur 24 unterschiedliche Aminosäuren aufweist (Abbildung 3.27). Aus diesem Grund wurde Kmpv_{PL1} als weiterer Referenzkanal einbezogen und zunächst seine elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht.

Kmpv _{SP1}	MTPIDKFKLIVIVALLYGFIYSRMDPEEFGFSSPLDPYYFSFT	43
Kmpv _{PL1}	MTPIDKFKLVITVALLYGYLYSLMEPEEFGFKTALDPYYFSFT	43
	*****: : *****: : * * : ***** . : *****	
Kmpv _{SP1}	TMSSVGYGDS SPKTDRAKLLVMTQQVFIFGEILKLLMFKRKSK	86
Kmpv _{PL1}	TMSSVGYGDFSPITGRAKMLAMTQQAFIFGEILKVLIEF-SK	85
	***** * * * . * * : * . * * * . * * * * * : : : * *	

Abbildung 3.27: Alignment der Aminosäure-Sequenzen von Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1}. Der Selektivitätsfilter ist in grün und die TMs sind in grau hinterlegt. Sterne markieren gleiche, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

In vorherigen Arbeiten ergab sich bereits, dass Kmpv_{PL1} nach Expression in HEK293-Zellen in der *whole-cell* Konfiguration keine Leitfähigkeit zeigt. Die Stromantwort und die Strom-Spannungskurve zeigen den typischen Verlauf einer untransfizierten HEK293-Zelle (Abbildung 3.28). Es wurde vermutet, dass das Protein nicht in die Zellmembran eingebaut wird (Siotto, 2017).

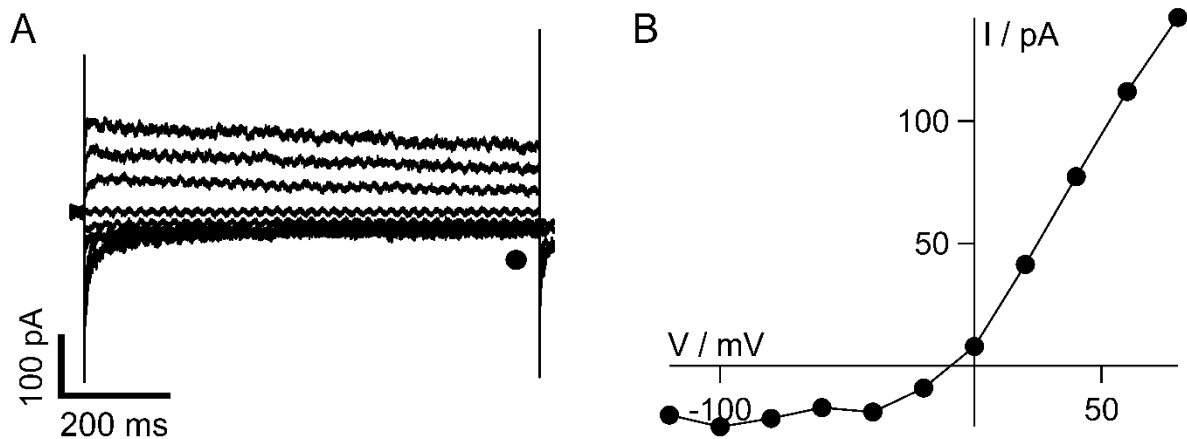


Abbildung 3.28: Kmpv_{PL1} zeigt keine Leitfähigkeit in HEK293-Zellen. Stromantworten einer mit Kmpv_{PL1}::EGFP transfizierten HEK293-Zelle (A, geschlossenen Kreise). Die Stromantwort wurden mit dem Standard-Pulsprotokoll und den Standard-Lösungen, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurve ist in B aus den stationären Strömen (A) dargestellt (verändert nach Siotto, 2017).

Um zu überprüfen, ob es sich bei Kmpv_{PL1} um einen funktionellen K⁺-Kanal handelt, wurde das Protein im planaren Lipid-Bilayer rekonstituiert und funktionell untersucht. Aufgrund des zellfreien Systems ist eine elektrophysiologische Messung unabhängig von der Sortierung des

Proteins möglich. In Abbildung 3.29 A sind die Stromspuren bei unterschiedlichen angegebenen Haltespannungen in einer symmetrischen 100 mM K^+ -Lösung und 10 mM HEPES (pH 7,0) in einer DPhPC-Membran abgebildet. Bei negativen Haltespannungen sind deutliche Einzelkanalfluktuationen zu erkennen. Hingegen sind im positiven Spannungsbereich keine Schaltereignisse zu verzeichnen: Der K^+ -Kanal Kmpv_{PL1} ist wie der Kmpv_{SP1} ein Einwärtsgleichrichter. Dies wird nochmal in der Strom-Spannungskurve deutlich; hier wurde wieder der zeitgemittelte Strom, wie oben beschrieben, aufgetragen (Abbildung 3.29 B). Bei einer Referenzspannung von -160 mV ergibt sich eine zeitgemittelte Einzelkanalamplitude von -10,92 pA, bei 160 mV beträgt diese nur 0,48 pA. Der Strom bei positiven Spannungen ergibt sich vermutlich aufgrund der zunehmenden Rauschbreite bei positiveren Spannungen.

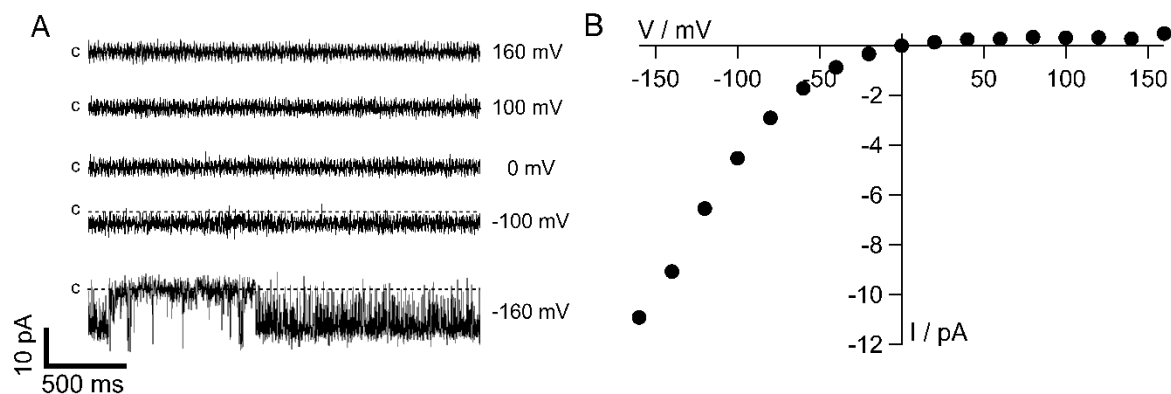


Abbildung 3.29: Kmpv_{PL1} zeigt eine Einwärtsgleichrichtung im planaren Lipid-Bilayer. Repräsentative Stromspuren des Kanalproteins Kmpv_{PL1} mit Einzelkanalfluktuationen in symmetrischer Lösung mit 100 mM K^+ und 10 mM HEPES (pH 7,0). Kanalaktivität wurde in DPhPC-Membran bei angegebenen Haltespannungen gemessen (A). C markiert den Geschlossenzustand. Die Stromspuren wurden digital bei 500 Hz gefiltert. B zeigt die Strom-Spannungskurven des zeitgemittelten Stroms (I).

Sowohl Kmpv_{SP1} als auch Kmpv_{PL1} zeigen eine Einwärtsgleichrichtung und beide besitzen eine ähnliche Aminosäure-Sequenz, wie die von Kmpv₁, welcher eine lineare K⁺-Leitfähigkeit aufweist. Aus diesem Grund wurden in folgendem Teil der Arbeit strukturelle Unterschiede zwischen den drei genannten Kmpv-Kanälen untersucht, um den Mechanismus der intrinsischen Gleichrichtung zu verstehen. Zunächst wurden Punktmutationen aller grau hinterlegten Aminosäuren der ersten TM (Abbildung 3.30) durch SDM-PCR erstellt und anschließend elektrophysiologisch untersucht. Die Aminosäuren wurden gewählt, da Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1} an diesen Stellen identische Aminosäuren aufweisen und sich diese von Kmpv₁ unterscheiden. Es wurde immer von Kmpv_{SP1} ausgehend in Richtung Kmpv₁ mutiert. Folgende Punktmutationen wurden hergestellt:

- Kmpv_{SP1} Δ2-4, Kmpv_{SP1} D5K, Kmpv_{SP1} K6T, Kmpv_{SP1} F7V, Kmpv_{SP1} K8L, Kmpv_{SP1} L9N, Kmpv_{SP1} V13I, Kmpv_{SP1} A14T, Kmpv_{SP1} L15T

Anschließend wurden die Mutanten in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration in den Standard-Lösungen gemessen. Für die Stromantworten wurde folgendes Protokoll angelegt: Anfangshaltespannung von 0 mV, Kommandospannungen von -160 mV bis 80 mV in 20 mV Schritten, Endhaltespannung von -80 mV.

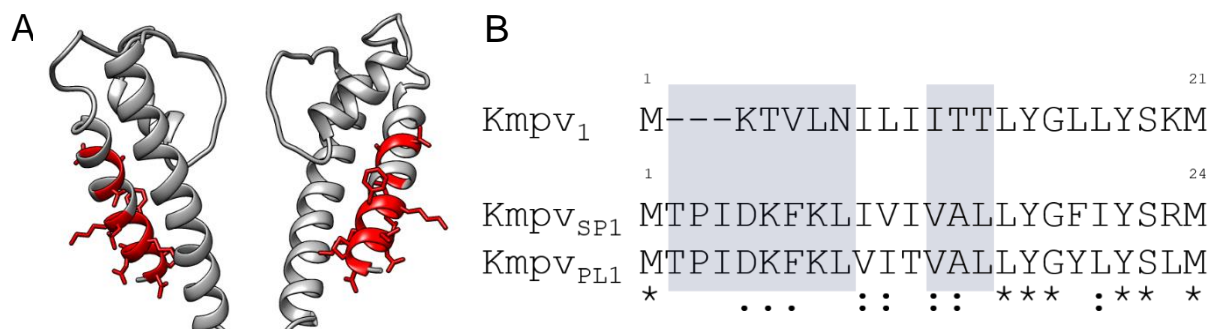


Abbildung 3.30: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der ersten TMs von Kmpv₁, Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1}. In A ist das Homologiemodell von Kmpv_{SP1} dargestellt. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt. In A (rot) und in B (grau) sind die Aminosäuren markiert, die für Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1} identisch sind, sich aber von Kmpv₁ unterscheiden. Im Alignment markieren Sterne, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

In Abbildung 3.31 sind die mittleren Strom-Spannungskurven von allen oben genannten Mutanten dargestellt. Als Referenz dienen die Strom-Spannungskurven von $Kmpv_1$, als Vertreter für einen K^+ -Kanal mit ohmscher Leitfähigkeit und die Kennlinie von $Kmpv_{SP1}$, als Beispiel für einen Einwärtsgleichrichter. Um die Daten von unterschiedlichen Mutanten und aus unterschiedlichen Messungen miteinander zu vergleichen wurden die mittleren Ströme, bei einer Haltespannung von -100 mV auf -1 normiert, aufgetragen. Die absoluten Werte der mittleren Ströme \pm Standardabweichung sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle oben genannten Kmp_{SP1} -Mutanten eine Einwärtsgleichrichtung aufweisen. Die Strom-Spannungskurven verlaufen wie die Strom-Spannungskurve des einwärtsgleichrichtenden $Kmpv_{SP1}$ Kanals. Nur $Kmpv_{SP1}$ F7V zeigt im negativen Spannungsbereich eine negative Kennlinie. Ab einer Haltespannung von ca. -100 mV wird der Einwärtsstrom wieder geringer.

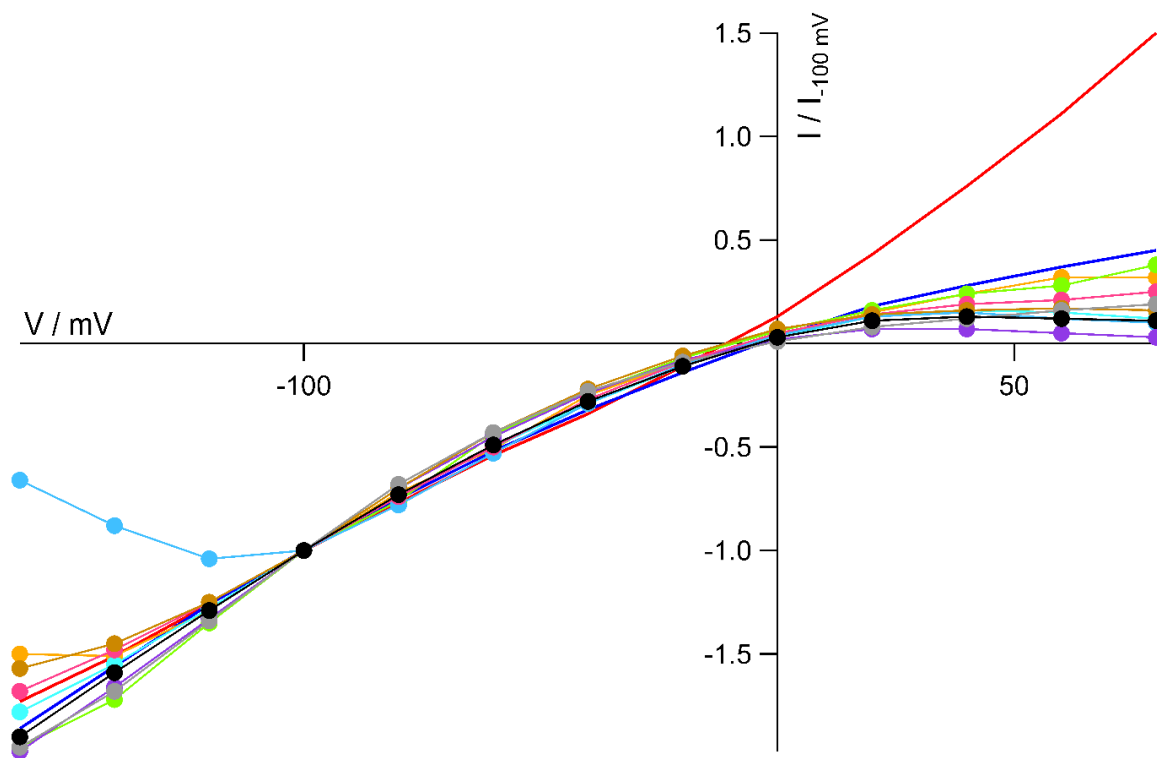


Abbildung 3.31: Alle Punktmutationen in der ersten TM führen nicht zum Verlust der Einwärtsgleichrichtung. Dargestellt sind die Strom-Spannungskurven folgender Punktmutationen des viralen K^+ -Kanals $Kmpv_{SP1}$: $Kmpv_{SP1} \Delta 2-4$ (orange), $Kmpv_{SP1}$ D5K (hellgrün), $Kmpv_{SP1}$ K6T (cyan), $Kmpv_{SP1}$ F7V dunkel (blaugrün), $Kmpv_{SP1}$ K8L (schwarz), $Kmpv_{SP1}$ L9N (lila), $Kmpv_{SP1}$ V13I (rosa), $Kmpv_{SP1}$ A14T (braun) und $Kmpv_{SP1}$ L15T (grau). Als Referenz wurden $Kmpv_1$ (rot) und $Kmpv_{SP1}$ (blau) eingefügt. Die Strom-Spannungskurven wurden normiert, indem der Strom bei einer Haltespannung von -100 mV gleich -1 gesetzt wurde. Alle Stromantworten wurden in Standard-Lösungen mit folgendem Protokoll aufgenommen: Anfangshaltespannung von 0 mV, Kommandospannungen von -160 mV zu 80 mV in 20 mV Schritten, Endhaltespannung von -80 mV.

Um die Gleichrichtung der jeweiligen Mutanten im Vergleich zu Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ darzustellen, wurde der jeweilige RI nach Gleichung 3.9 in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abbildung 3.32). Als Referenz dienen der Kmpv₁, als symmetrisch leitender K⁺-Kanal, der Kmpv_{SP1}, als Einwärtsgleichrichter und als Kontrolle untransfizierte HEK293-Zellen. Kmpv₁ weist entsprechend seiner linearen Leitfähigkeit einen RI von ungefähr 1 auf (RI=1,16 ± 0,21, n=55). Der RI für Kmpv_{SP1} liegt bei 0,40 ± 0,17 (n=64) und für untransfizierte HEK293-Zellen ungefähr bei 4 (RI=4,02 ± 2,88, n=18). Alle Punktmutationen der ersten TM liegen im Bereich des RI von Kmpv_{SP1}. Eine Auflistung aller Rektifizierungs-Indizes (RIs) ist im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

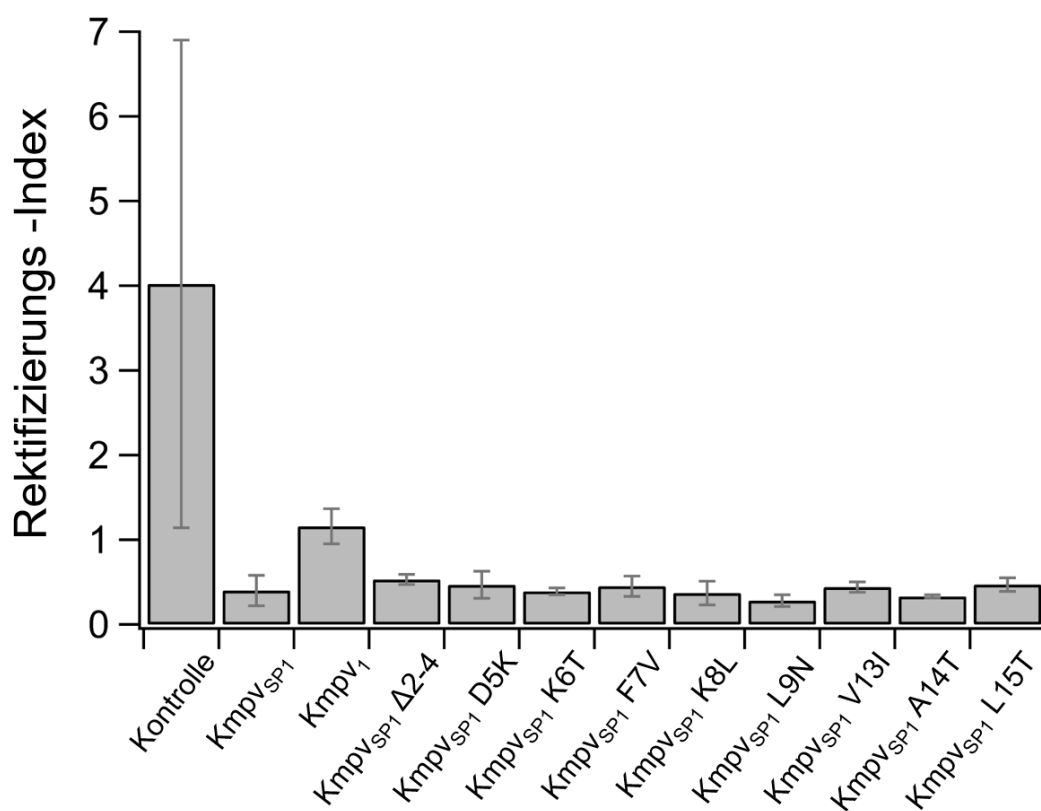


Abbildung 3.32: Alle Kmpv_{SP1} Mutanten der ersten TM zeigen eine Einwärtsgleichrichtung. Dargestellt sind die mittleren RIs mit Standardabweichung. Der jeweilige RI wurde mit Hilfe der Gleichung 3.9 berechnet. Kontrolle untransfizierter HEK293-Zellen (n=18), Kmpv_{SP1}::EGFP (n=64), Kmpv₁::EGFP (n=55), Kmpv_{SP1} Δ2-4::EGFP (n=3), Kmpv_{SP1} D5K::EGFP (n=6), Kmpv_{SP1} K6T::EGFP (n=3), Kmpv_{SP1} F7V::EGFP (n=7), Kmpv_{SP1} K8L::EGFP (n=6), Kmpv_{SP1} L9N::EGFP (n=4), Kmpv_{SP1} V13I::EGFP (n=4), Kmpv_{SP1} A14T::EGFP (n=5), Kmpv_{SP1} L15T::EGFP (n=3).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der ersten TM keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung hat.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Teil der Arbeit die zweite TM untersucht. Hier wurde genauso vorgegangen, wie für die Auswahl der Punktmutationen in der ersten TM. In Abbildung 3.33 ist das Alignment der viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{SP1}, Kmpv_{PL1} und Kmpv₁ der zweiten TM dargestellt. In grau sind die Aminosäuren markiert, die in Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1} identisch sind, sich aber von Kmpv₁ unterscheiden. Es wurden folgende Kmpv_{SP1}-Mutanten hergestellt:

- Kmpv_{SP1} R59A, Kmpv_{SP1} L63V, Kmpv_{SP1} T66S, Kmpv_{SP1} Q68H, Kmpv_{SP1} F70V, Kmpv_{SP1} I71M, Kmpv_{SP1} F72I, Kmpv_{SP1} I75L, Kmpv_{SP1} L76A, Kmpv_{SP1} Δ 83-86

Anschließend wurden die Kmpv_{SP1}-Mutanten in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der Patch-Clamp Technik in der *whole-cell* Konfiguration, wie in Abbildung 3.31 gemessen.

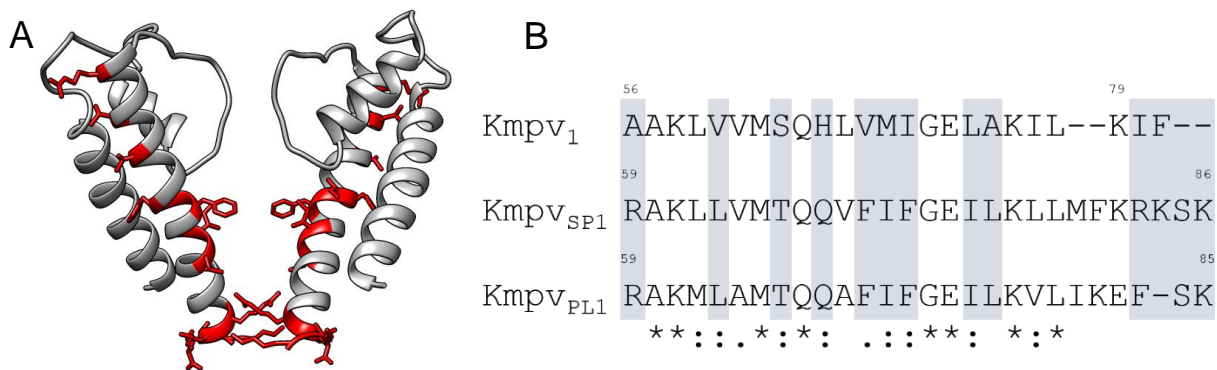


Abbildung 3.33: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM der viralen K⁺-Kanäle Kmpv₁, Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1}. In A ist das Homologiemodell von Kmpv_{SP1} dargestellt. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt. In A (rot) und in B (grau) sind die Aminosäuren markiert, die für Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1} identisch sind, sich aber von Kmpv₁ unterscheiden. Im Alignment markieren Stern, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

Die normierten Strom-Spannungskurven der Kmpv_{SP1}-Mutanten sowie der Referenzkanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ sind in Abbildung 3.34 dargestellt; die entsprechenden absoluten Werte sind im Anhang in Tabelle 9.1 zusammengefasst.

Es fällt auf, dass fast alle Mutanten einen ähnlichen Verlauf aufweisen wie Kmpv_{SP1}. Nur Kmpv_{SP1} F72I zeigt einen Verlauf wie der von Kmpv₁. Kmpv_{SP1} F72I weist sowohl bei positiven, als auch bei negativen Haltespannungen einen Strom auf. Es handelt sich bei Kmpv_{SP1} F72I demnach um einen K⁺-Kanal mit einer ohmschen Leitfähigkeit.

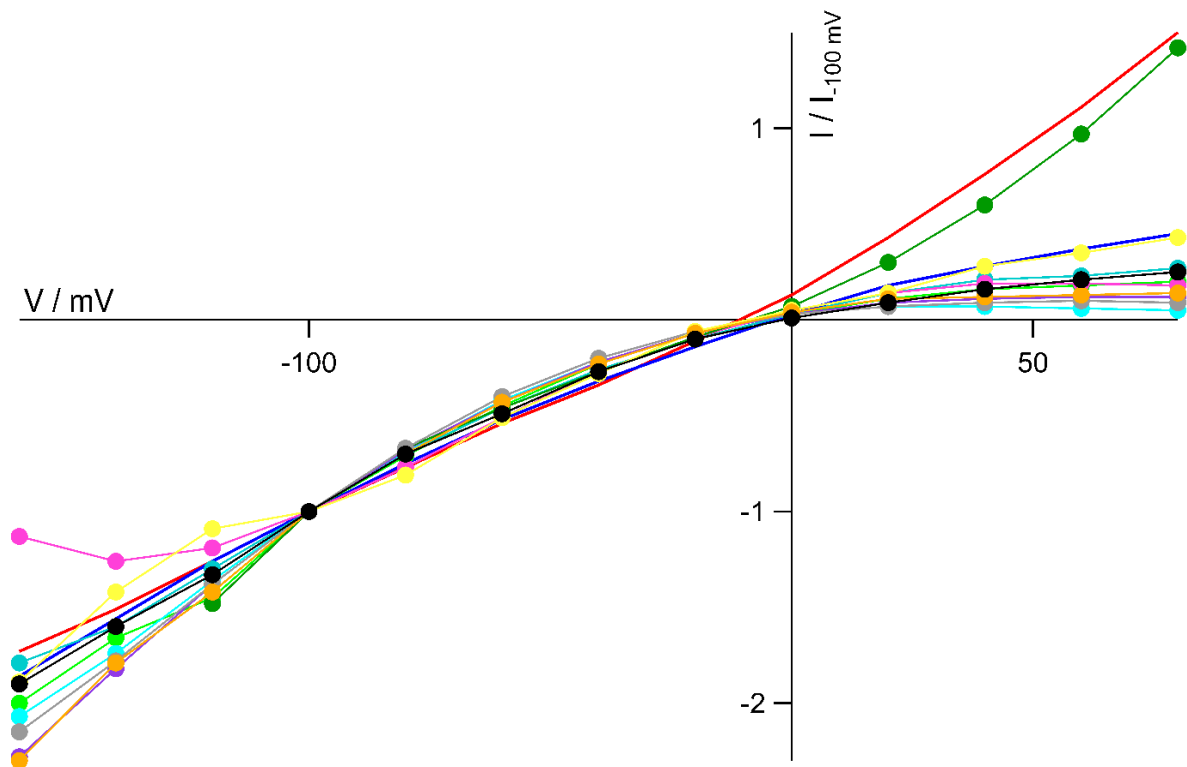


Abbildung 3.34: Nur Kmpv_{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung. Dargestellt sind die Strom-Spannungskurven folgender Mutanten des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1}: Kmpv_{SP1} R59A (orange), Kmpv_{SP1} L63V (hellgrün), Kmpv_{SP1} T66S (cyan), Kmpv_{SP1} Q68H (dunkles blaugrün), Kmpv_{SP1} F70V (lila), Kmpv_{SP1} I71M (rosa), Kmpv_{SP1} F72I (dunkelgrün), Kmpv_{SP1} I75L (grau), Kmpv_{SP1} L76A (gelb) und Kmpv_{SP1} Δ 83-86 (schwarz). Als Referenz wurden Kmpv₁ (rot) und Kmpv_{SP1} (blau) eingefügt. Die Strom-Spannungskurven wurden normiert, in dem der Strom bei einer Haltespannung von -100 mV gleich -1 gesetzt wurde. Alle Stromantworten wurden wie in Abbildung 3.31 aufgenommen.

Um die Einwärtsgleichrichtung zu quantifizieren, wurden die jeweiligen RIs nach Gleichung 3.9 berechnet und in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abbildung 3.35). Als Referenz dienen Kmpv₁, als symmetrisch leitender K⁺-Kanal, Kmpv_{SP1}, als Einwärtsgleichrichter und untransfizierte HEK293-Zellen, als Kontrolle. Kmpv₁ weist einen mittleren RI von $1,16 \pm 0,21$ (n=55) auf, für Kmpv_{SP1} liegt er bei $0,40 \pm 0,17$ (n=64) und für untransfizierte HEK293-Zellen bei $4,02 \pm 2,88$ (n=18).

Wie bei den Mutanten der ersten TM zeigt auch die Mehrzahl der Mutanten der zweiten TM RIs im Bereich von 0,5 bis 0,3. Nur die Kmpv_{SP1} F72I Mutante sticht deutlich heraus und liegt mit einem RI von $1,30 \pm 0,34$ (n=15) deutlich bei dem RI von Kmpv₁. Die Werte der RIs sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

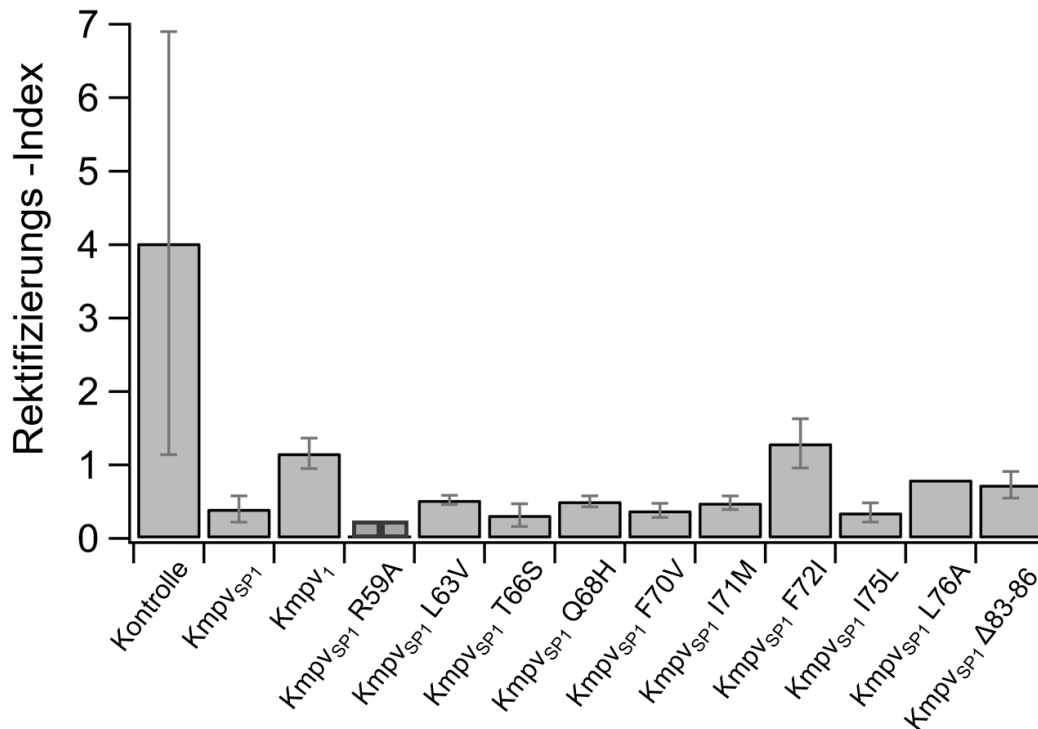


Abbildung 3.35: Nur Kmpv_{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung. Dargestellt sind die mittleren RIs, welcher mit Hilfe der Gleichung 3.9 bestimmt wurden, mit Standardabweichung aller Kmpv_{SP1} Mutanten in der zweiten TM. Kontrolle untransfizierter HEK293-Zellen (n=18), Kmpv_{SP1}::EGFP (n=64), Kmpv₁::EGFP (n=55), Kmpv_{SP1} R59A::EGFP (n=2), Kmpv_{SP1} L63V::EGFP (n=5), Kmpv_{SP1} T66S::EGFP (n=3), Kmpv_{SP1} Q68H::EGFP (n=3), Kmpv_{SP1} F70V::EGFP (n=4), Kmpv_{SP1} I71M::EGFP (n=6), Kmpv_{SP1} F72::EGFP I (n=15), Kmpv_{SP1} I75L::EGFP (n=3), Kmpv_{SP1} L76A::EGFP (n=1) und Kmpv_{SP1} Δ83-86::EGFP (n=3).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Substitution der Aminosäure Phenylalanin zu Isoleucin an Stelle 72 in Kmpv_{SP1} zu einem Verlust der Einwärtsgleichrichtung führt. In Abbildung 3.36 A ist eine repräsentative Stromantwort einer mit Kmpv_{SP1} F72I::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in Standard-Lösungen dargestellt. Die Stromantwort wurde mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Es ist ein Ein- und Ausstrom zu erkennen, der allerdings im Vergleich zum Wildtyp-Kanal Kmpv_{SP1} wesentlich geringer ist. Die Kmpv_{SP1} F72I Mutante weist bei -100 mV einen mittleren Einstrom von $172,25 \pm 111,96$ pA (n=15) auf, hingegen liegt der mittlere Einstrom bei Kmpv_{SP1} mit $862,19 \pm 554,73$ pA (n=64) deutlich höher. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem geringen Strom um einen K⁺-Strom handelt, wurde bei der gleichen Zelle 10 mM Ba²⁺ in die externe Lösung hinzugegeben und anschließend wurde die Stromantwort wie zuvor aufgenommen. Sowohl der Einstrom, als auch der Ausstrom werden nach Zugabe von 10 mM Ba²⁺ reduziert. Dies wird auch in der Strom-Spannungskurve deutlich (Abbildung 3.36 C). Die Ergebnisse aus diesen Messungen unterstreichen, dass die geringe

Leitfähigkeit, die durch die Mutante in HEK293-Zellen erzeugt wird, tatsächlich ein K^+ -Strom ist und keine unspezifische Hintergrundleitfähigkeit.

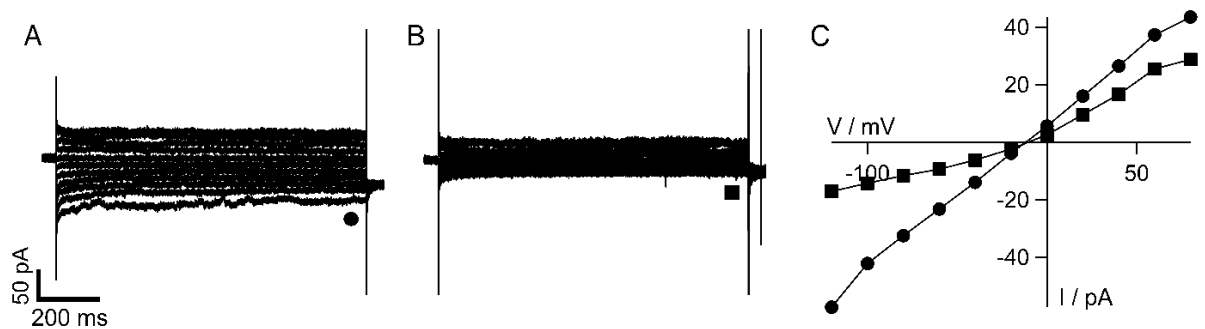


Abbildung 3.36: Kmpv_{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung in HEK293-Zellen. Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1} F72I::EGFP transfizierten HEK293-Zelle in einer externen Lösung mit 50 mM K^+ in Abwesenheit (A, ausgefüllte Kreise) und Anwesenheit von 10 mM Ba^{2+} (B, ausgefüllte Vierecke). Die Stromantworten wurden, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen. Die dazugehörigen Strom-Spannungskurven in C wurden aus den stationären Strömen (A und B) dargestellt.

Um Informationen über die Offenwahrscheinlichkeit und die Einzelkanalamplitude zu erhalten, wurde Kmpv_{SP1} F72I in einem planaren Bilayer rekonstituiert und anschließend in einer symmetrischen 100 mM K^+ -Lösung in einer DPhPC-Membran gemessen. Die typischen Stromspuren einer Bilayer-Messung von Kmpv_{SP1} F72I sind in Abbildung 36.7 A dargestellt. Im Gegensatz zum Schalten des Wildtyp-Kanals, welcher bei positiven Spannungen keine Schaltereignisse zeigt, fällt auf, dass die Mutante sowohl bei negativen Haltespannungen, als auch bei positiven Haltespannungen deutlich erkennbare Schaltereignisse aufweist. Bei einer Referenzspannung von -100 mV erhält man einen Einzelkanalstrom von -0,65 pA und bei 100 mV einen Strom von 0,7 pA. Der mittlere Strom von Kmpv_{SP1} F72I ist im Vergleich zu Kmpv_{SP1} bei -100 mV um das 3,5-Fache kleiner. Die Amplitudengröße ähnelt eher der des Einzelkanalstroms von Kmpv₁ in einem planaren Lipid-Bilayer. Um die Schaltereignisse besser zu erkennen, wurden einzelne Schaltereignisse aus A, als Vergrößerung dargestellt (Abbildung 3.37 B). In Abbildung 3.37 C wurde die Offenwahrscheinlichkeit gegen die angelegte Haltespannung aufgetragen. Aus dem Plot wird deutlich, dass Kmpv_{SP1} F72I vor allem bei negativen Spannungen eine hohe Offenwahrscheinlichkeit zeigt. So liegt die Offenwahrscheinlichkeit bei -200 mV bei 93% allerdings bei 200 mV nur bei 2%.

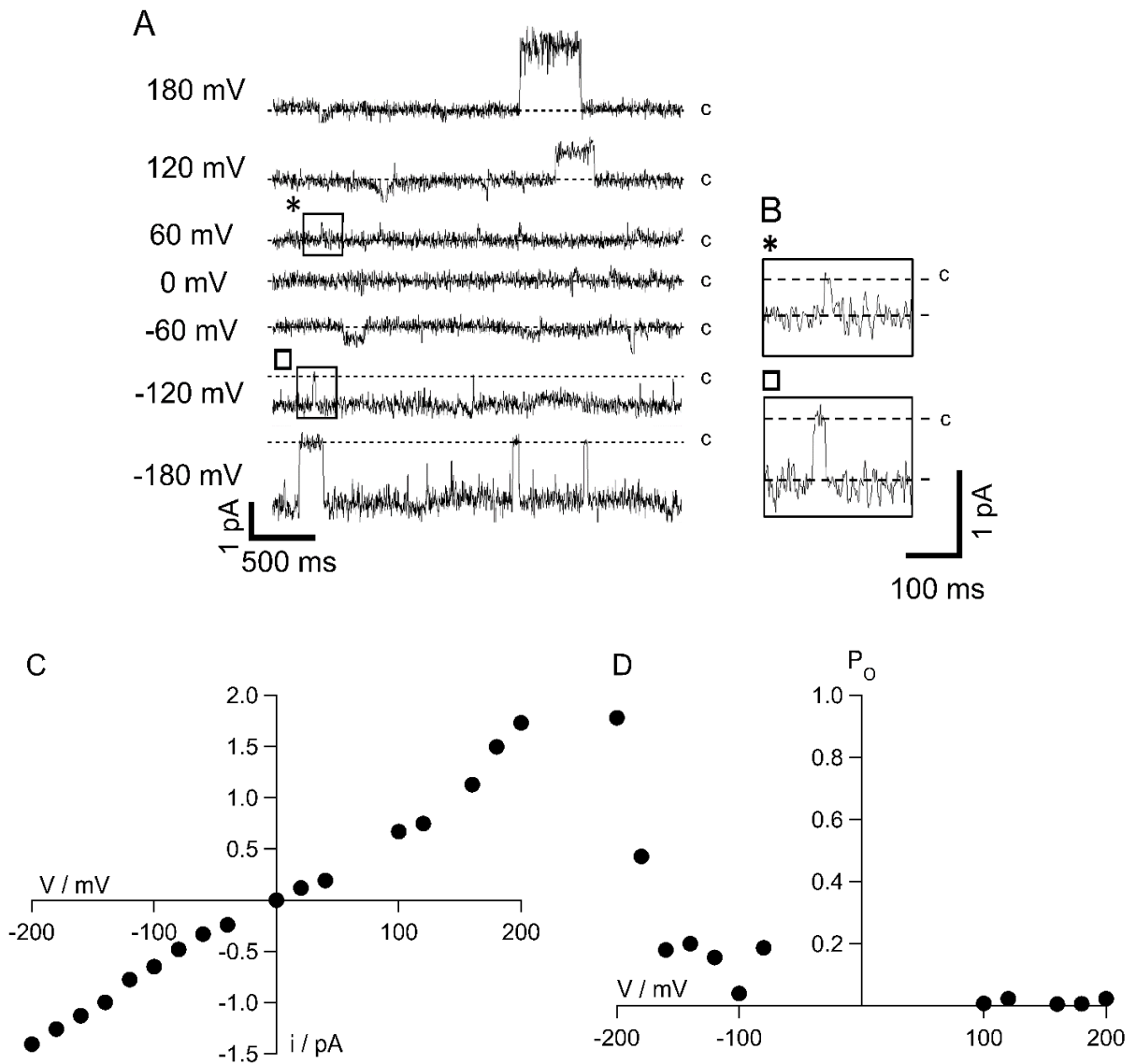


Abbildung 3.37: Kmpv_{SP1} F72I zeigt Schaltereignisse im positiven Spannungsbereich im planaren Lipid-Bilayer. Repräsentative Stromspuren des Kanalproteins Kmpv_{SP1} F72I mit Einzelkanalfuktuationen bei symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung und 10 mM HEPES (pH 7,0) in DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen (A). In B ist die Vergrößerung aus A dargestellt, die vergrößerten Bereiche sind in A mit einem Rechteck und den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet. C markiert den Geschlossenzustand. Die Stromspuren wurden digital bei 100 Hz gefiltert und bei Kommandospannungen für 60 Sekunden von 200 mV bis -200 mV in 20 mV Schritten aufgenommen. In C sind die Strom-Spannungskurven der Einzelkanalamplitude aus A dargestellt und in D ist die Offenwahrscheinlichkeit gegen die Spannung aufgetragen.

Trägt man das Produkt aus Offenwahrscheinlichkeit und Einzelkanalamplitude gegen die Spannung auf, wird allerdings deutlich, dass die zeitgewichtete Aktivität von Kmpv_{SP1} F72I aufgrund der geringen Offenwahrscheinlichkeit im positiven Spannungsbereich ein Einwärtsgleichrichter ist (Abbildung 3.38). Bei negativ angelegten Haltespannungen ist ein

deutlicher Strom zu verzeichnen, hingegen ist bei positiven Spannungen unter Berücksichtigung der Offenwahrscheinlichkeit in der zeitgewichteten Strom-Spannungskurve kaum ein Strom zuerkennen.

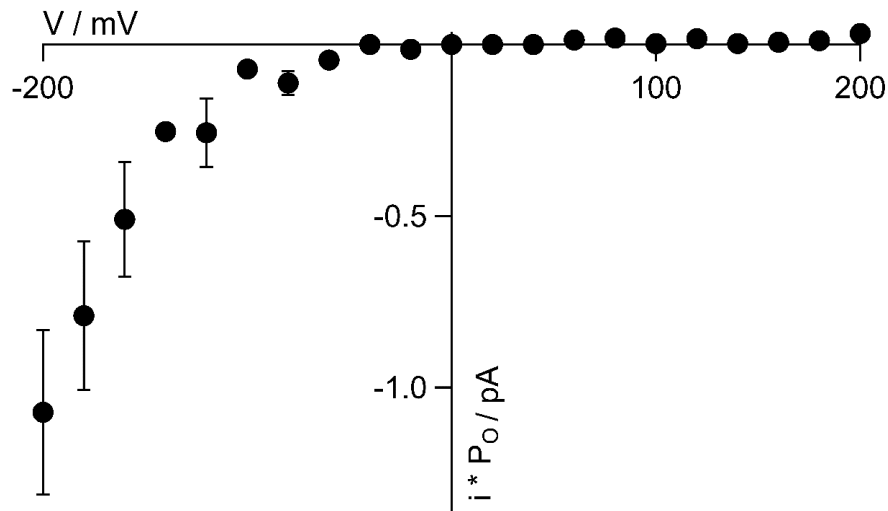


Abbildung 3.38: Kmpv_{SP1} F72I zeigt eine Einwärtsgleichrichtung unter Berücksichtigung der Offenwahrscheinlichkeit. Dargestellt ist das Produkt aus der Offenwahrscheinlichkeit und der Einzelkanalamplitude in Abhängigkeit von der Spannung. Die Standardabweichung wurde mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

Um zu testen, ob ein Ersetzen der aromatischen Aminosäure F durch I an Stelle 72 auch in anderen einwärtsgleichrichtenden Kmpv-artigen Kanälen zu Schaltereignissen im positiven Spannungsbereich führt, wurde die gleiche Mutation auch in Kmpv_{PL1} eingefügt. Auch Kmpv_{PL1} besitzt an der Stelle 72 die Aminosäure Phenylalanin (Abbildung 3.33). Hierfür wurde die Kmpv_{PL1}-Mutante in einen planaren Lipid-Bilayer rekonstituiert und in einer 100 mM K⁺-Lösung mit 10 mM HEPES (pH 7,0) in einer DPhPC-Membran gemessen. Die Stromspuren von Kmpv_{PL1} F72I sind in Abbildung 3.39 A dargestellt. Kmpv_{PL1} F72I verhält sich wie die Wildtyp-Kanäle Kmpv_{PL1} und Kmpv_{SP1}, denn Kmpv_{PL1} F72I zeigt bei positiven Haltespannungen keine Schaltereignisse. Dies wird auch in der zeitgemittelten Strom-Spannungskurve deutlich (Abbildung 3.39 B). So erhält man bei einer Referenzspannung von -160 mV einen zeitgemittelten Strom von 3,6 pA und bei 160 mV nur einen Strom von 0,03 pA. Es wurde wieder auf den zeitgemittelten Strom zurückgegriffen, da es aufgrund des *Flicker-Gating* zu keinem eindeutigen Öffnen- und Schließen des Kanals kommt. Aus diesem Grund ergibt sich bei positiven Spannungen ein minimaler Strom, der auf die Vergrößerung der Rauschbreite zurückzuführen ist.

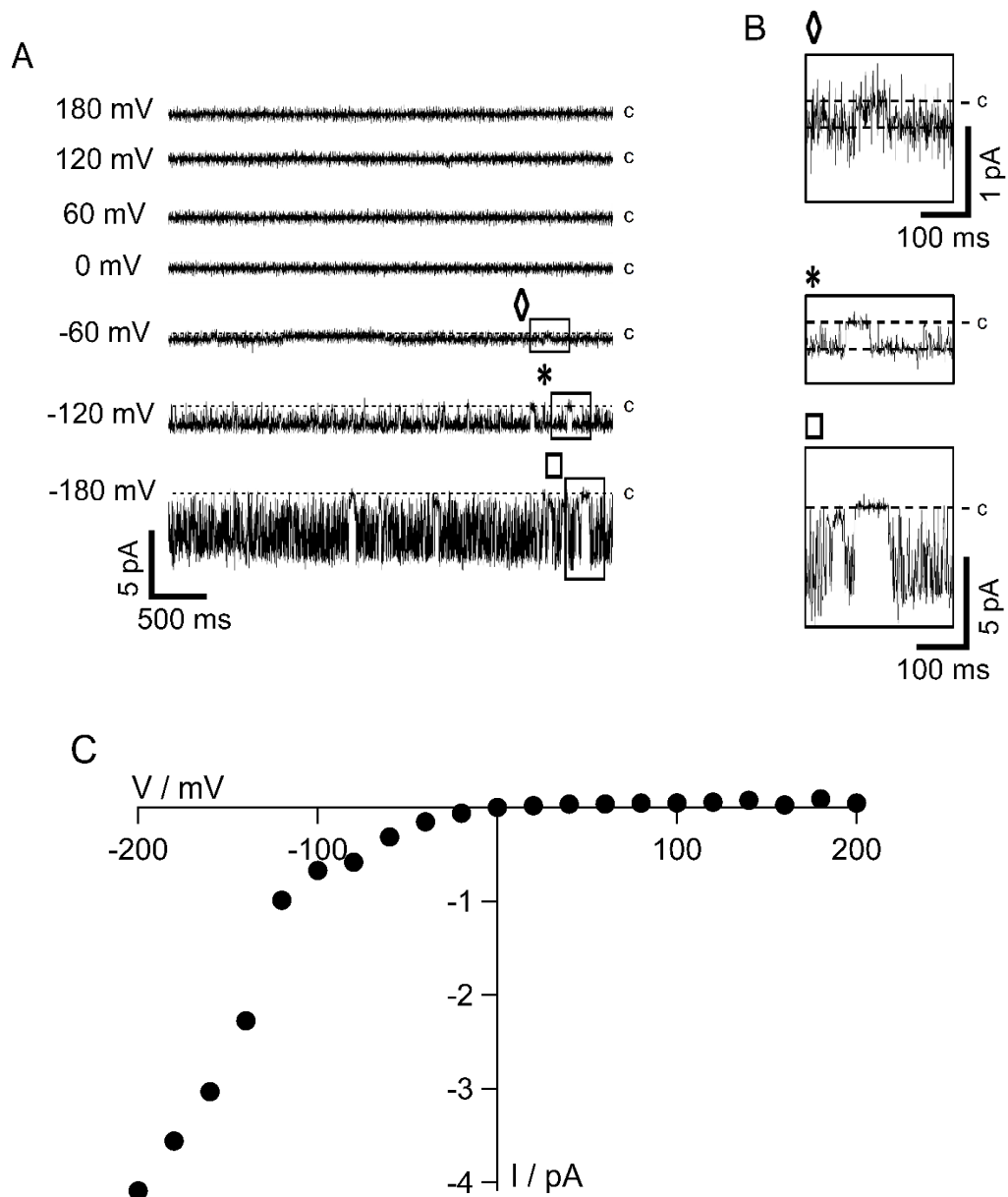


Abbildung 3.39: Kmpv_{PL1} F72I zeigt keine Schaltereignisse im positiven Spannungsbereich im planaren Lipid-Bilayer. Repräsentative Stromspuren des Kanalproteins Kmpv_{PL1} F72I mit Einzelkanalfluktuationen bei symmetrischer 100 mM K⁺-Lösung und 10 mM HEPES (pH 7,0) in DPhPC-Membran und angegebenen Haltespannungen (A). In B ist die Vergrößerung aus A dargestellt, die vergrößerten Bereiche sind in A mit einem Rechteck und den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet. C markiert den Geschlossenzustand. Die Stromspuren wurden digital bei 100 Hz gefiltert. C stellt die Strom-Spannungskurven des zeitgemittelten Stroms (I) aus A gegen die Spannung dar.

Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeiten in den Aminosäure-Sequenzen der beiden K⁺-Kanäle, zeigt die Substitution der Aminosäure Phenylalanin zu Isoleucin, wie sie Kmpv₁ an vergleichbarer Stelle aufweist, ein unterschiedliches elektrophysiologisches Verhalten nach Rekonstitution in einen planaren Lipid-Bilayer. Kmpv_{SP1} F72I zeigt bei positiven

Haltespannungen Offenereignisse, hingegen zeigt Kmpv_{PL1} F72I kein Kanal-Schalten bei positiven Spannungen. Kmpv_{PL1} F72I verhält sich wie Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1}. Berücksichtigt man allerdings bei Kmpv_{SP1} F72I die Offenwahrscheinlichkeit, bleibt auch hier die Einwärtsgleichrichtung erhalten.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Kmpv_{SP1} F72I nach Berücksichtigung der Offenwahrscheinlichkeit weiterhin eine Einwärtsgleichrichtung zeigt. Allerdings kann nach Expression in HEK293-Zellen keine Einwärtsgleichrichtung und nur ein geringer Strom beobachtet werden. Aus diesem Grund wird im folgenden Teil der Arbeit die Stelle 72 in Kmpv_{SP1} durch weitere Punktmutationen untersucht und mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen. Die Aminosäure Phenylalanin wurde jeweils durch die Aminosäuren Alanin, Leucin und Tyrosin substituiert. Bei Alanin handelt es sich um eine unpolare Aminosäure, welche sehr kurz ist und so kaum sterische Effekte auslösen kann, hingegen ist Leucin um 3 C-Atome länger und ähnelt der Aminosäure Isoleucin in ihren Eigenschaften. Tyrosin wurde gewählt, weil sie wie Phenylalanin eine aromatische Gruppe, aber mit einer OH-Gruppe, aufweist. In Abbildung 3.40 sind die Stromantworten einer mit Kmpv_{SP1} F72A::EGFP (A), Kmpv_{SP1} F72L::EGFP (C) und Kmpv_{SP1} F72Y::EGFP (E) transfizierten HEK293-Zellen dargestellt. Die Stromantworten wurden in den Standard-Lösungen und dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1 aufgenommen. Nach Substitution der Aminosäure Phenylalanin durch Alanin, Leucin oder Tyrosin zeigt sich, dass die Einwärtsgleichrichtung in allen Mutanten erhalten bleibt. Dies ist auch in der jeweiligen Strom-Spannungskurve zu sehen, welche mit den entsprechenden Symbolen aus den stationären Strömen in Abbildung 3.40 B, D und F aufgetragen wurden. Die mittleren Ströme sind deutlich höher als die der von Kmpv_{SP1} F72I. Die mittleren Ströme sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

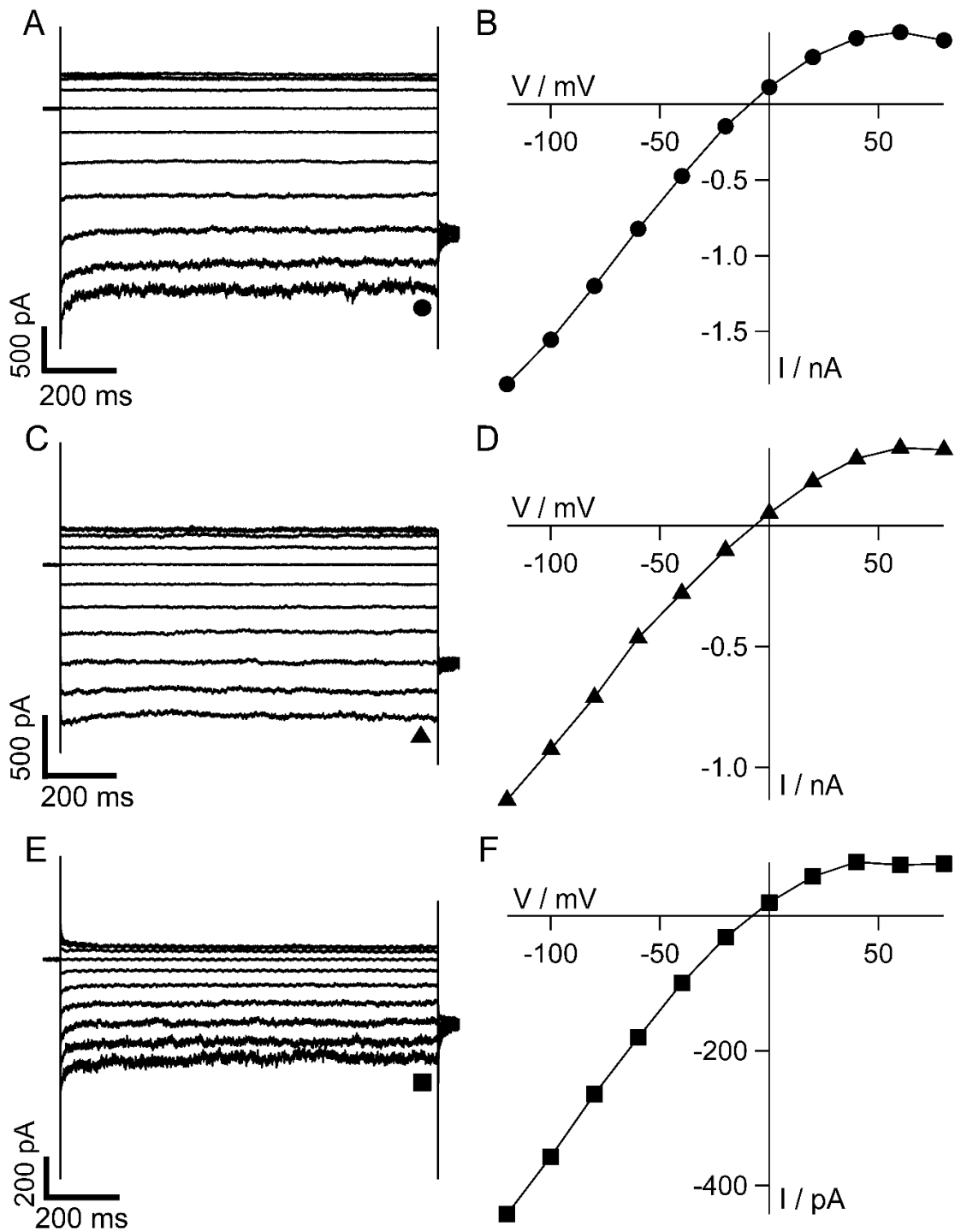


Abbildung 3.40: Alanin, Leucin und Tyrosin haben keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung. Stromantworten und entsprechende Strom-Spannungskurve einer mit Kmpv_{SP1} F72A::EGFP (A, B), Kmpv_{SP1} F72L::EGFP (C, D) und Kmpv_{SP1} F72Y::EGFP (E, F) transfizierten HEK293-Zelle. Alle Stromantworten wurden in Standard-Lösungen und mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen.

Eine Substitution der Aminosäure Phenylalanin durch Alanin, Leucin oder Tyrosin an Stelle 72 im K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} hat keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit des Kanals. Die Mutanten funktionieren weiterhin als Einwärtsgleichrichter.

3.3.2. Strukturuntersuchungen des viralen K⁺-Kanals Kmpv_{SP1} durch Chimären

Nachdem auf der Ebene von Punktmutationen keine eindeutige Erklärung für die Einwärtsgleichrichtung von Kmpv_{SP1} gefunden werden konnte, wurden im folgenden Teil der Arbeit Chimären erstellt, um die inhärenten Strukturen, welche für die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} verantwortlich sind, einzugrenzen. Eine Übersicht der Aminosäure-Sequenzen und der K⁺-Leitfähigkeit aller Chimären ist im Anhang in Abbildung 9.1 dargestellt.

Hierfür wurden Chimären aus Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ mit Hilfe der Chimären-PCR hergestellt und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration untersucht. Da bereits bekannt ist, dass die TMs für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich sind, wurden diese als gesamte Domäne untersucht. Es ist durchaus möglich, dass nicht nur eine Aminosäure allein, sondern ein ganzer Abschnitt in einer Domäne für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist.

Zunächst wurde die zweite TM untersucht. Die folgenden Chimären bestehen immer aus der ersten TM und der Porenregion aus Kmpv_{SP1}. Die zweite TM wurde durch Bereiche des Kmpv₁ Kanals, wie folgt, ausgetauscht:

- Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁: Aminosäuren 59-79 stammen aus Kmpv₁
- Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁: Aminosäuren 59-72 stammen aus Kmpv₁
- Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁: Aminosäuren 73-82 stammen aus Kmpv₁

In Abbildung 3.41 sind die entsprechenden Aminosäure-Sequenzen der Chimären im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Kanälen Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} dargestellt.

	56	79
Kmpv ₁	AAKLVVMSQHLVMIGELAKIL--KIF--	
	59	86
Kmpv _{SP1}	RAKLLVMTQQVFIFGEILKLLMFKRKSK	
	59	79
Kmpv _{SP1} /TM2 Kmpv ₁	AAKLVVMSQHLVMIGELAKIL--KIF--	
	59	86
Kmpv _{SP1} /TM2-1 Kmpv ₁	AAKLVVMSQHLVMIGEILKLLMFKRKSK	
	59	82
Kmpv _{SP1} /TM2-2 Kmpv ₁	RAKLLVMTQQVFIFGELAKIL--KIF--	

Abbildung 3.41: Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM von Kmpv_{SP1}, Kmpv₁ und deren Chimären. In grün ist die Aminosäure-Sequenz von Kmpv₁, in blau die Aminosäure-Sequenz von Kmpv_{SP1} dargestellt und die Chimären sind entsprechend in grün und blau dargestellt.

Die Chimären wurden als Fusionsprotein mit EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration, wie in Abbildung 3.1, gemessen. In Abbildung 3.42 A ist die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle dargestellt. In den Messungen ist ein geringer Ausstrom zu erkennen, jedoch kaum Einstrom. Die dazugehörige Strom-Spannungskurve des stationären Stroms ist in B dargestellt. Bei -100 mV wird ein Einstrom von nur 5 pA registriert; bei 80 mV sind es 15 pA. Dies ist deutlich geringer als der mittlere Strom einer untransfizierten HEK293-Zelle, dieser liegt bei -100 mV bei $-58,9 \pm 66,6$ pA (n=18) und bei 80 mV bei $196,6 \pm 142,2$ pA (n=18). In Abbildung 3.42 C ist die Stromantwort einer HEK293-Zelle, welche Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁::EGFP exprimiert, dargestellt. Diese Mutante generiert eine lineare K⁺-Leitfähigkeit, wobei der Strom sehr gering ausfällt. Dies zeigt sich auch in der Strom-Spannungskurve (Abbildung 3.42 D), in welcher die stationären Ströme aufgetragen wurden, deutlich. Der Einstrom liegt bei -100 mV bei 35 pA und der Ausstrom bei 80 mV bei 40 pA. Im Vergleich zu einer untransfizierten HEK293-Zelle sind die Ströme wieder sehr gering. Die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle ist in Abbildung 3.42 E dargestellt. Bei den Strömen und der dazugehörigen stationären Strom-Spannungskurve ist eine deutliche Einwärtsgerichtung zu erkennen (Abbildung 3.42 F). Bei -100 mV zeigt sich ein Einstrom von 250 pA und bei 80 mV nur ein Ausstrom von 55 pA. Außerdem ist auffällig, dass der Einstrom bei einer Spannung negativer als -100 mV wieder abnimmt.

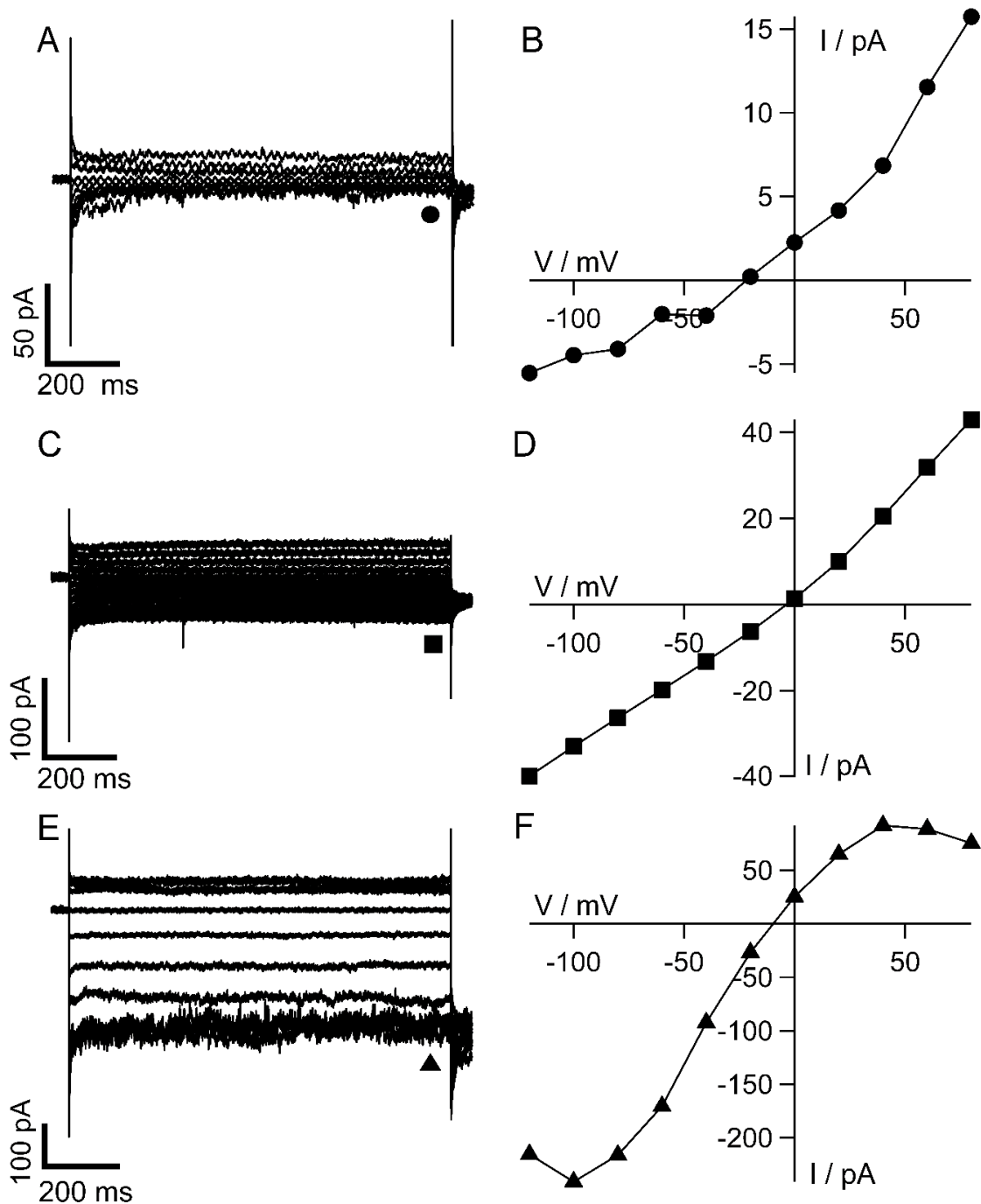


Abbildung 3.42: Der C-terminale Teil der zweiten TM hat keinen Einfluss auf die Einwärtsgerichtung. A zeigt die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle. Die Stromantwort wurde digital bei 500 Hz gefiltert. Die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme ist in B dargestellt. C zeigt die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle, die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme sind in D gezeigt. In E ist die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle dargestellt, die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme ist in F gezeigt. Alle Stromantworten wurden in den Standard-Lösungen und mit dem Standard-Pulsprotokoll, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen.

Um die K^+ -Leitfähigkeit der Chimären (Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁, Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁ und Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁) zu quantifizieren und mit den Wildtyp-Kanälen Kmpv₁, Kmpv_{SP1} bzw. untransfizierten HEK293-Zellen zu vergleichen, wurden die jeweiligen mittleren RIs nach Gleichung 3.9 berechnet und in Abbildung 3.42 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁ weiterhin eine Einwärtsgleichrichtung aufweist, so liegt der mittlere RI mit $0,56 \pm 0,08$ (n=4) bei dem des Kmpv_{SP1} mit $0,3 \pm 0,188$ (n=64). Der mittlere RI der Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁ ist mit $1,23 \pm 0,62$ (n=7) ähnlich dem von Kmpv₁, welcher einen mittleren RI von $1,16 \pm 0,21$ (n=55) zeigt. Die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁ hat einen mittleren RI von $1,92 \pm 0,63$ (n=16) und ist somit etwas höher, als alle andere. Dies liegt daran, dass wie bei untransfizierten HEK293-Zellen der Ausstrom höher ist als der Einstrom. Sowohl die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁ als auch die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁ wurden in Abbildung 3.43 grau schraffiert, weil beide keinen nennenswerten Strom aufweisen, welcher sich von dem einer untransfizierten HEK293-Zelle unterscheidet. Eine Aussage über die Gleichrichtung ist nicht eindeutig möglich, da bei solch geringen Stromantworten der Ausstrom von den HEK293-Zellen resultieren kann und kein Einfluss der Chimäre ist. Die mittleren Ströme und mittleren RIs aller Chimären sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

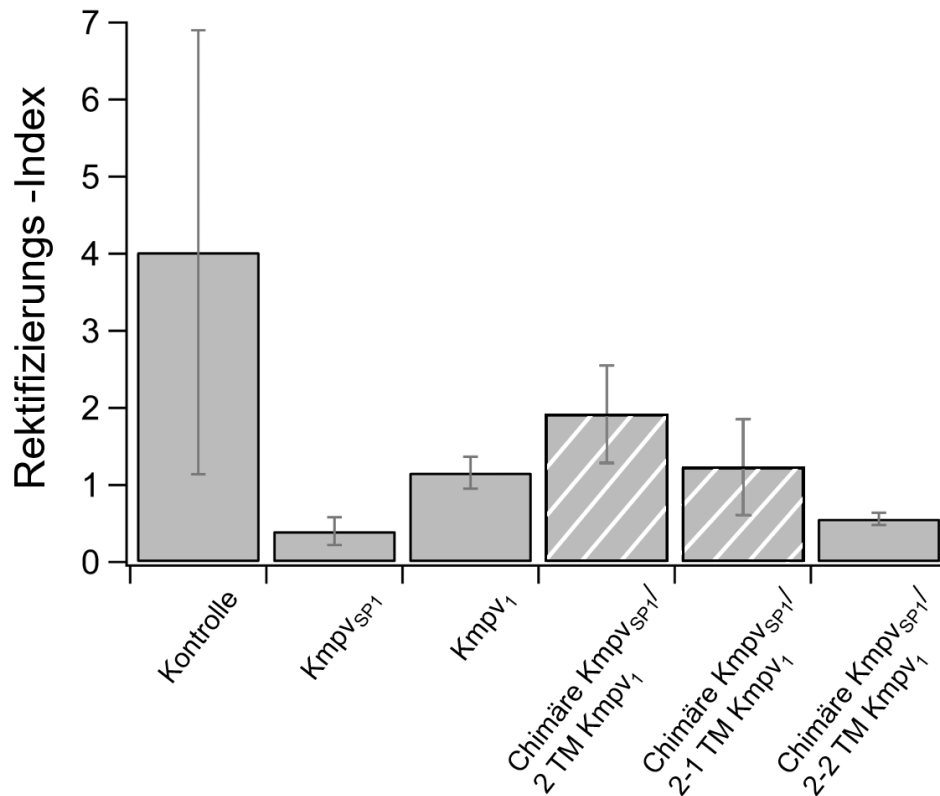


Abbildung 3.43: Der C-terminale Teil der zweiten TM hat keinen Einfluss auf die Gleichrichtung.

Dargestellt sind die RIs der Chimären im Vergleich zu den parentalen Kanälen und untransfizierter HEK293-Zellen als Kontrolle. Die RIs wurden mit der Gleichung 3.9 berechnet und als Mittelwerte \pm Standardabweichung für die Kontrolle (untransfizierter HEK293-Zelle) (n=18), Kmpv_{SP1}::EGFP (n=64), Kmpv₁::EGFP (n=55), Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁::EGFP (n=16), Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁::EGFP (n=7) und Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁::EGFP (n=4) dargestellt. Die Schraffierung gibt an, dass sich der gemessene Strom, nicht von dem einer untransfizierten HEK293-Zelle unterscheidet.

Nur die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁ zeigt weiterhin eine eindeutige Einwärtsgleichrichtung, was bedeutet, dass der hintere Teil der zweiten TM (Aminosäuren 73-82) keinen Einfluss auf die Gleichrichtung besitzt. Eine eindeutige Aussage über die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2 Kmpv₁ und die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁ ist nicht möglich, da der Strom wesentlich kleiner ist als der der Wildtyp-Kanäle Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} und sogar kleiner als der von untransfizierten HEK293-Zellen. Es ist möglich, dass die Mutationen dazu führen, dass die Chimären nicht mehr funktionell in der Membran vorliegen und deshalb einen geringen Strom zeigen.

Um eine genaue Aussage über den ersten Teil der zweiten TM (Aminosäuren 59-72) treffen zu können, wurde dieser nochmals aufgeteilt und elektrophysiologisch mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik untersucht:

- Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁: Aminosäuren 59-65 stammen von Kmpv₁
- Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv₁: Aminosäuren 66-72 stammen von Kmpv₁

In Abbildung 3.44 sind die entsprechenden Aminosäure-Sequenzen der Chimären (Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁ und Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv₁) im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Kanälen Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} und der Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv₁ dargestellt.

Kmpv ₁	56	79	AAKLVMMSQHLVMIGELAKIL--KIF--
Kmpv _{SP1}	59	86	RAKLLVMTQQVFIFGEILKLLMFKRKSK
Kmpv _{SP1} /TM2-1 Kmpv ₁	59	86	AAKLVMMSQHLVMIGEILKLLMFKRKSK
Kmpv _{SP1} /TM2-1-1 Kmpv ₁	59	86	AAKLVMMSQHLVMIGEILKLLMFKRKSK
Kmpv _{SP1} /TM2-1-2 Kmpv ₁	59	86	RAKLLVMSQHLVMIGEILKLLMFKRKSK

Abbildung 3.44: Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM von Wildtyp-Kanälen Kmpv_{SP1}, Kmpv₁ und deren Chimären. In grün ist die Aminosäure-Sequenz von Kmpv₁, in blau die Aminosäure-Sequenz von Kmpv_{SP1} dargestellt und die Chimären sind entsprechend in grün und blau dargestellt.

Die Chimären wurden als Fusionsprotein mit EGFP in HEK293-Zellen exprimiert und mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration, wie in Abbildung 3.1, gemessen. In Abbildung 3.45 A ist die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle dargestellt. Bei dieser Mutante ist ein geringer Ausstrom und ein noch geringerer Einstrom zu erkennen; die Chimäre zeigt keinen Strom, der über den einer untransfizierten HEK293-Zelle hinausgeht. Die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme ist in Abbildung 3.45 B dargestellt. Bei -100 mV ergibt sich ein Einstrom von 10 pA und bei 80 mV ein Ausstrom von 90 pA. Der Verlauf der Stromantwort und der Strom-Spannungskurve erinnert an den Verlauf der einer untransfizierten HEK293-Zelle. Bei untransfizierten HEK293-Zellen liegt der mittlere Einstrom bei -100 mV bei $58,9 \pm 66,6$ pA

($n=18$) und der mittlere Ausstrom bei 80 mV bei $196,6 \pm 142,2$ pA ($n=18$). In Abbildung 3.45 C ist die Stromantwort einer HEK293-Zelle, die die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁::EGFP exprimiert, dargestellt. In diesem Fall ist bei den Strömen und der dazugehörige stationären Strom-Spannungskurve eine deutliche Einwärtsgleichrichtung zu erkennen (Abbildung 3.45 C und D). Bei -100 mV ist der Einstrom 700 pA und bei 80 mV der Ausstrom 95 pA.

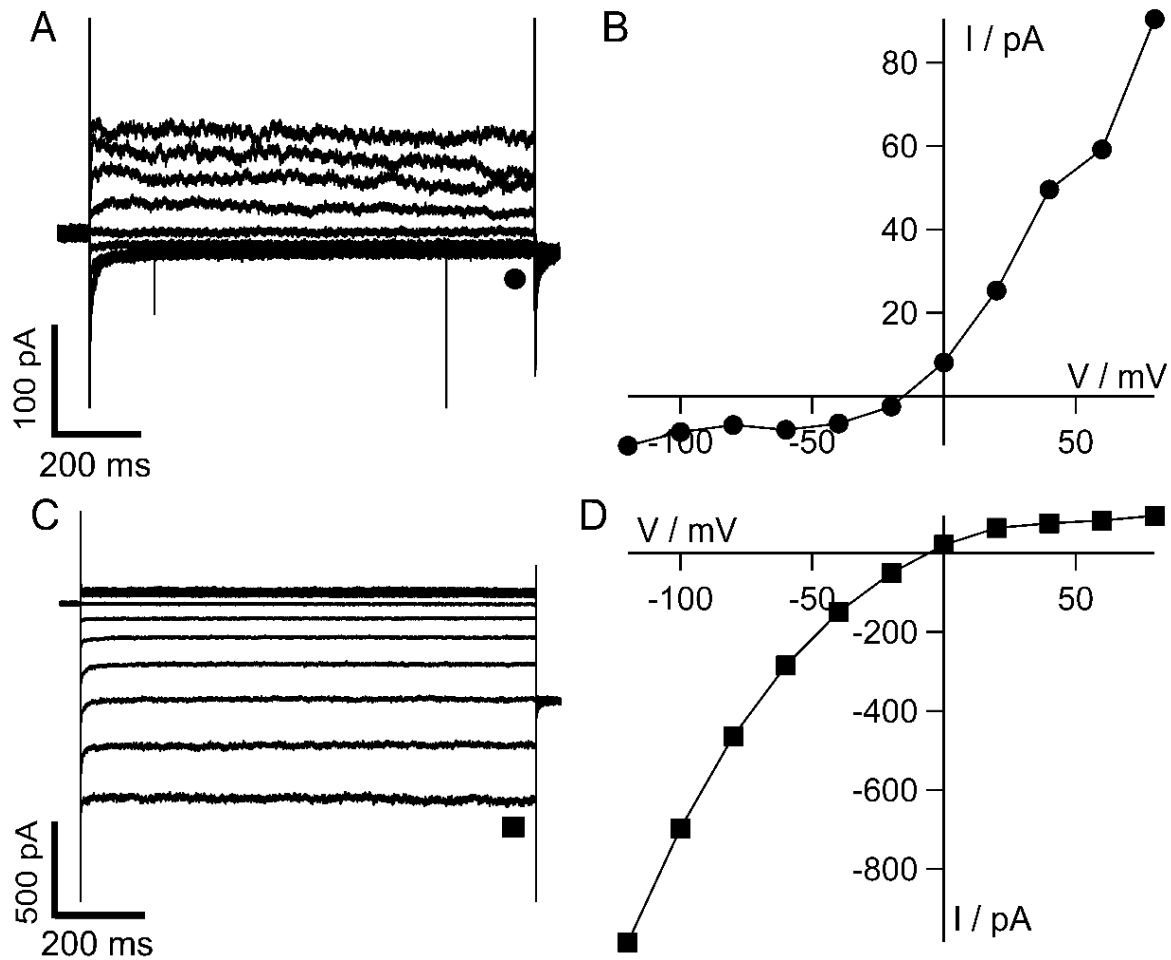


Abbildung 3.45: Die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁ zeigt eine Einwärtsgleichrichtung. A zeigt die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle. Die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme ist in B dargestellt. C zeigt die Stromantwort einer mit Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁::EGFP transfizierten HEK293-Zelle, die dazugehörige Strom-Spannungskurve der stationären Ströme ist in D dargestellt. Alle Stromantworten wurden, wie in Abbildung 3.1, aufgenommen.

Um auch in diesen Fällen die K^+ -Leitfähigkeit der Chimären (Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv_1$ und Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv_1$) zu quantifizieren und mit den Wildtyp-Kanälen $Kmpv_1$ und $Kmpv_{SP1}$ und untransfizierter HEK293-Zellen als Kontrolle zu vergleichen, wurden die jeweiligen mittleren RIs nach Gleichung 3.9 berechnet und in Abbildung 3.46 dargestellt. Hier wird die Einwärtsgleichrichtung der Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv_1$, im Vergleich zu $Kmpv_{SP1}$, nochmals deutlich. $Kmpv_{SP1}$ weist einen mittleren RI von $0,40 \pm 0,17$ ($n=64$) und die Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv_1$ einen mittleren RI von $0,48 \pm 0,22$ ($n=4$) auf. Hingegen liegt der mittlere RI der Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv_1$ mit $3,42 \pm 2,27$ ($n=7$) deutlich höher als der von $Kmpv_1$ ($1,16 \pm 0,21$; $n=55$) und liegt im Bereich untransfizierter HEK293-Zellen ($4,02 \pm 2,88$, $n=18$). Die mittleren Ströme und mittleren RIs sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

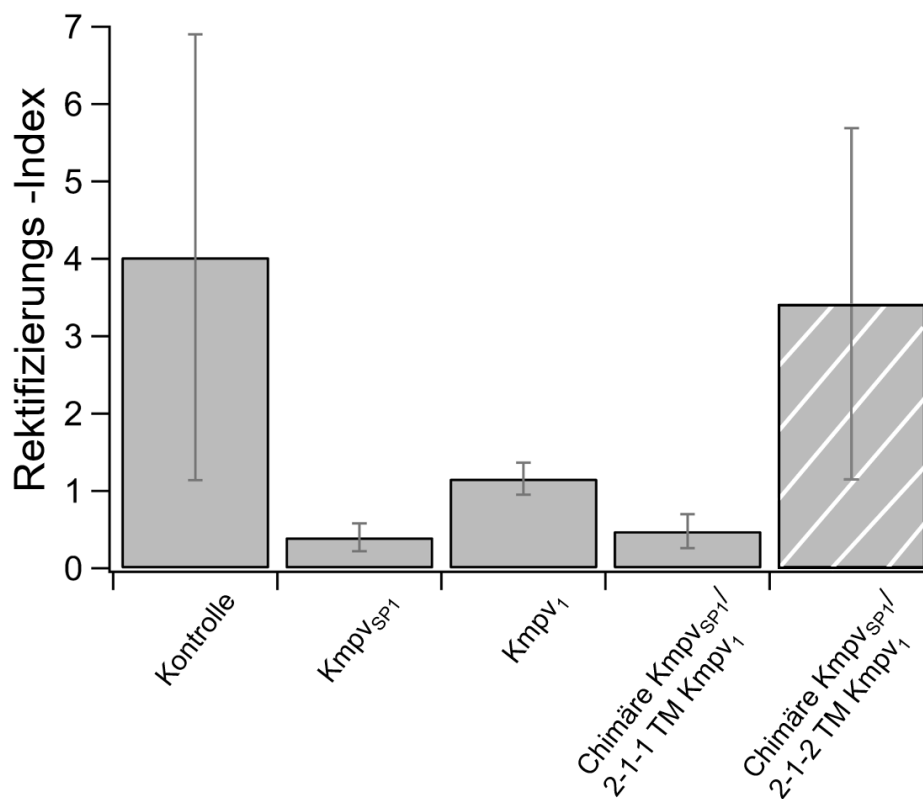


Abbildung 3.46: Die Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv_1$ zeigt eine Einwärtsgleichrichtung. Dargestellt sind die RIs der Chimären im Vergleich zu den parental Kanälen und untransfizierter HEK293-Zellen als Kontrolle. Die RIs wurden mit der Gleichung 3.9 berechnet und als Mittelwerte \pm Standardabweichung für die Kontrolle (untransfizierte HEK293-Zellen) ($n=18$), $Kmpv_{SP1}$ ($n=64$), $Kmpv_1$ ($n=55$), Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv_1$ ($n=4$) und Chimäre $Kmpv_{SP1}/TM2-1-2 Kmpv_1$ ($n=7$) dargestellt. Die Schraffierung gibt an, dass sich der gemessene Strom, nicht von dem einer untransfizierten HEK293-Zelle unterscheidet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Einwärtsgleichrichtung in der Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1-1 Kmpv₁ erhalten bleibt. Allerdings zeigt die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM 2-1- Kmpv₁ einen Strom, welcher sogar niedriger ist als der von untransfizierten HEK293-Zellen (Abbildung 3.46, grau schraffiert). In diesem Bereich weisen die beiden Kanäle sechs von sieben unterschiedlichen Aminosäuren auf. Der Einfluss von fünf der betreffenden Aminosäuren auf die Gleichrichtereigenschaften, wurde bereits in Kapitel 6.3.1 untersucht. Alle Punktmutationen zeigen in den Experimenten eine Einwärtsgleichrichtung und können demnach als Ursache für die Gleichrichtung ausgeschlossen werden. Ein Mechanismus, welcher für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist, kann in dieser Arbeit nicht erklärt werden, es sind weitere Mutationsstudien notwendig. Hierfür wäre es sinnvoll, die erste TM auf ähnliche Art und Weise mit Hilfe von Chimären zu untersuchen.

4. Diskussion

Viren besitzen codierende Sequenzen für K^+ -Kanäle. Diese weisen die gleichen strukturellen Eigenschaften wie die Poren aller bisher bekannten komplexeren K^+ -Kanäle auf (Gazzarrini *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). So verfügen die viralen K^+ -Kanäle über zwei TMs, welche über den Porenloop einschließlich typischer Signatursequenz TXXTXGY/FG verbunden sind; meistens haben sie auch einen, wenn auch kurzen zytoplasmatischen C- und N-Terminus (Gazzarrini *et al.*, 2003). Somit bestehen die minimalistisch aufgebauten K^+ -Kanäle nur aus der funktionellen Einheit, welche notwendig ist, um K^+ über die Plasmamembran zu leiten. Der Shaker-Kanal, der ein Beispiel für einen komplexeren K^+ -Kanal darstellt, besteht aus sechs TMs (Bezania, 2000). Dieser besitzt mehr als 600 Aminosäuren pro Untereinheit, hingegen weist der Prototyp der viralen K^+ -Kanäle, KcV_{PBCV-1}, nur 94 Aminosäuren auf (Plugge *et al.*, 2000). Dieser Vergleich macht deutlich, dass die viralen K^+ -Kanäle ein gutes Werkzeug zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der K^+ -Kanäle sind, da sie sich aufgrund ihres minimalen Aufbaus besonders gut zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen mittels Mutationsstudien eignen. Neben dem KcV_{PBCV-1}, welcher von dem *Paramecium bursaria* Chlorellavirus codiert wird, wurden bereits viele andere virale K^+ -Kanäle untersucht, die in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften, wie z.B. dem Mechanismus des Gatings, sehr gut untersucht sind (Gazzarrini *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2017).

In dieser Arbeit wurden virale K^+ -Kanäle untersucht, welche auch zu der Familie der Phycodnaviren, wie der KcV_{PBCV-1}, gehören. Allerdings stammen die codierenden Sequenzen aus einem Virus, welches die Grünalge *Micromonas pusilla* befällt (Feng und Curtis, 1996; Siotto *et al.*, 2014). Die Kmpv-Kanäle bestehen aus weniger als 90 Aminosäuren pro Untereinheit; der bisher kleinste bekannteste K^+ -Kanal Kmpv_{12T} stammt aus dem Genom des *Micromonas Pusilla* 12T Virus (Siotto *et al.*, 2014, Siotto, 2017). Weitere Kanäle sind Kmpv_{SP1} und Kmpv₁, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden. Nach Expression in HEK293-Zellen oder Rekonstitution im Lipid-Bilayer zeigt Kmpv_{SP1} nur im negativen Spannungsbereich eine K^+ -Leitfähigkeit. Es ist demnach ein Einwärtsgleichrichter. Hingegen leitet Kmpv₁ K^+ bei positiven und negativen Haltespannungen annähernd gleich gut; er leitet K^+ demnach wie ein ohmscher Leiter (Siotto *et al.*, 2014, Siotto, 2017). Trotz dieses drastischen elektrophysiologischen Unterschiedes in der Spannungsabhängigkeit der beiden Kanäle zeigen sie eine sehr ähnliche Aminosäure-Sequenz (Abbildung 3.12). Aufgrund dessen dienen die beiden K^+ -Kanäle als ein

vielversprechendes Werkzeug, um ein tieferes Verständnis in die Mechanismen der unterschiedlichen Spannungsabhängigkeiten der Kanäle zu erhalten.

Eine Möglichkeit zur Erklärung für die unterschiedlichen Schalteigenschaften der Kanäle könnte prinzipiell im Selektivitätsfilter verortet sein. Neben der unterschiedlichen K^+ -Leitfähigkeit weisen die beiden K^+ -Kanäle eine unterschiedliche Sensitivität für die typischen K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} und Cs^+ auf und zeigen eine unterschiedliche Leitfähigkeit für Rb^+ . All diese Unterschiede deuten an, dass sich die Kanäle strukturell in dem Selektivitätsfilter unterscheiden. Eine Chimäre, bestehend aus der Porenregion von Kmpv₁ und den beiden TMs von Kmpv_{SP1} (TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁), zeigt jedoch, dass sowohl die Spannungsabhängigkeit als auch die Selektivität für Rb^+ gegen K^+ und die Sensitivität für Cs^+ unabhängig von der Porenregion sind. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigen recht eindeutig, dass die unterschiedlichen Spannungsabhängigkeiten von Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ keine direkte Funktion des Selektivitätsfilters sind. Diese Hypothese und die Bedeutung der TMs für das Schaltverhalten der Kanäle wird weiter unten noch einmal im Detail erörtert.

Die unterschiedlichen Funktionsweisen der beiden Kanäle hinsichtlich Kationenselektivität und Sensitivität für Cs^+ als Blocker ist sehr ungewöhnlich. Bei bisher allen bekannten K^+ -Kanälen wurde die Kationenselektivität wie auch die Sensitivität für Cs^+ mit Struktureigenschaften im Selektivitätsfilter in Verbindung gebracht (Sansom *et al.*, 2002).

Eine andere Situation ergibt sich bei der strukturellen Zuordnung des Ba^{2+} Blocks. Kmpv_{SP1} weist im Vergleich zu Kmpv₁ eine sehr hohe Ba^{2+} -Sensitivität auf. Bei Sequenzvergleichen der beiden Kanäle ist ein kritischer Unterschied direkt in der Umgebung des Selektivitätsfiltermotivs auffällig. Kmpv_{SP1} besitzt hier ein Serin, wohingegen Kmpv₁ an vergleichbarer Stelle ein Phenylalanin aufweist. Durch Mutationsstudien konnte hier gezeigt werden, dass diese sensible Stelle in der Filterregion für die unterschiedliche Sensitivität der beiden Kanäle für Ba^{2+} als Blocker verantwortlich ist. Nach Substitution der Aminosäure Serin durch Phenylalanin an der Stelle 53, welche Kmpv₁ an äquivalenter Stelle aufweist, ist es möglich die Ba^{2+} -Sensitivität auf die Ebene des Kmpv₁ zu reduzieren. Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, aus denen schon vermutet wurde, dass die strukturellen Grundlagen für Ba^{2+} - und Cs^+ -Blockierung unterschiedlich sind (Chatelain *et al.*, 2009; Gazzarrini *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). Aus den vorliegenden Daten kann man wenigstens für die viralen K^+ -Kanäle die Architektur der Filterregion für den Ba^{2+} -Block verantwortlich machen, während die Cs^+ -Empfindlichkeit eher von Strukturmerkmalen der TMs determiniert wird. Da Experimente an Kcv Kanälen aus Chlorellaviren zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen (Kang *et al.*, 2004), kann angenommen werden, dass dieses Strukturprinzip nicht auf die Kmpv-Kanäle reduziert

ist, sondern von größerer allgemeiner Bedeutung ist. Weitere Details zu Struktur-Funktionsbeziehungen bezüglich der Blockierung der Kanäle durch Cs^+ und Ba^{2+} werden weiter unten noch einmal im Detail erörtert.

4.1. Die Transmembran-Helices bestimmen die Rb^+ -Leitfähigkeit und sind verantwortlich für die Cs^+ -Sensitivität

K^+ -Kanäle sind Ionenkanäle, welche sehr selektiv für K^+ sind. So leiten sie K^+ bis zu 10.000-mal besser als Na^+ (Doyle *et al.*, 1998). Wie oben schon erwähnt wurde in dieser Arbeit die Selektivität des viralen K^+ -Kanals Kmp_{VSP1} für die Kationen Rb^+ und Na^+ getestet. Dabei zeigt Kmp_{VSP1} sowohl für Rb^+ als auch für Na^+ eine geringere Leitfähigkeit. Die Na^+ -Leitfähigkeit reduziert sich bei einer Referenzspannung von -100 mV im Vergleich zu Messungen mit K^+ um 97%. Beim Wechsel auf Rb^+ verringert sich die Leitfähigkeit bei gleicher Spannung nur um 40%. Kmp_{VSP1} leitet Kationen demnach in folgender Reihenfolge: $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+$. Die gleiche Selektivitätsreihe ist auch für andere K^+ -Kanäle bekannt (Heginbotham und MacKinnon, 1993; Hille, 2001; LeMasurier *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2014). Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da der Selektivitätsfilter des Kmp_{VSP1} die gleiche Konsensus-Sequenz wie alle bisher bekannten K^+ -Kanäle aufweist (Heginbotham *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2011). Die negativen Carbonyl-Sauerstoffatome der Carboxylgruppen der Aminosäuren im Selektivitätsfilter bilden eine Ersatz-Wasserhülle um K^+ , wodurch sie die Hydrathülle nachahmen (Doyle *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001). Dadurch wird die Energie für das Passieren von K^+ durch den K^+ -Kanal erheblich herabgesetzt (MacKinnon, 2003). Da Na^+ mit 0,95 Å wesentlich kleiner ist als K^+ mit 1,33 Å, kann Na^+ im Selektivitätsfilter nicht im gleichen Maße stabilisiert werden wie K^+ (Abbildung 1.5). Hingegen ist Rb^+ mit 1,48 Å etwas größer als K^+ und kann besser stabilisiert werden. Der Austausch der externen K^+ -Lösung durch eine Na^+ - oder Rb^+ -Lösung hat zur Folge, dass sich das Umkehrpotential in den negativeren Spannungsbereich verschiebt. Jedoch ist die Verschiebung nach einem Austausch einer K^+ -Lösung zu einer Na^+ -Lösung wesentlich höher als nach dem Austausch zu einer Rb^+ -Lösung (Abbildung 3.9 und 3.10). Dieses Verhalten des Kanals in Lösungen mit unterschiedlichen Kationen stimmt mit der Konstanten-Feld Theorie überein (Hille, 2001). Erstaunlicherweise zeigt der strukturell sehr ähnlich aufgebaute virale K^+ -Kanal Kmp_{V1} , der im Selektivitätsfilter zu 82% identisch ist, eine völlig unterschiedliche Rb^+ -Leitfähigkeit. So leitet Kmp_{V1} nach Expression in HEK293-Zellen Rb^+ 7-mal besser und nach Rekonstitution in einen Lipid-Bilayer 3-mal besser als K^+ . In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch die ähnliche Größe von Rb^+ im Vergleich zu K^+ , manche K^+ -Kanäle eine ähnlich große oder sogar leicht größere Leitfähigkeit für Rb^+ als für K^+ aufwiesen (Gazzarrini *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). Die strukturellen und funktionellen Mechanismen,

die diesem Phänomen in Kmpv₁ zugrunde liegen, können hier nicht weiter aufgeklärt werden. Bemerkenswert ist nur, dass ein Austausch von K⁺ zu Rb⁺ bei Kmpv₁ zu keiner Verschiebung des Umkehrpotentials führt. Aus der Verschiebung der Umkehrspannung ergibt sich eine relative Permeabilität des Kanals für Rb⁺ zu K⁺ von $1,06 \pm 0,11$ (n=10) (nach Gleichung 3.8). Dieser Wert ist wesentlich geringer als zu erwarten, da Kmpv₁ deutlich mehr Rb⁺ als K⁺ leitet. Die Diskrepanz zwischen der Leitfähigkeit und der Selektivität ist darauf zurückzuführen, dass sich das Umkehrpotential nach Austausch der externen Lösung von K⁺ zu Rb⁺ erstaunlicherweise nicht verschiebt. Dieses Verhalten lässt sich nicht mit der Konstanten-Feld-Theorie erklären und deutet eher auf eine kinetische Empfindlichkeit im Kanalschalten für Kationen hin, als auf eine unterschiedliche Selektivität.

Die Hypothese, dass die hohe Rb⁺ Leitfähigkeit nicht auf eine strukturelle Besonderheit des Filters in Kmpv₁ zurückgeführt werden kann, wird durch Experimente untermauert. Die Chimäre, bestehend aus der ersten und zweiten TM aus Kmpv_{SP1} (K⁺>Rb⁺) und der Porenregion aus Kmpv₁ (Rb⁺>K⁺) (TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁) zeigt eine ähnliche Rb⁺-Leitfähigkeit wie Kmpv_{SP1}, obgleich die Pore von einem anderen Kanal stammt. Das zeigt, dass die niedrige Rb⁺-Leitfähigkeit auf die TMs zurückzuführen sein muss. Dies ist zunächst sehr verwunderlich, da man bisher davon ausgegangen ist, dass die Selektivität eines K⁺-Kanals für Ionen im Selektivitätsfilter bestimmt wird (Heginbotham *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 1998). Da aber die TMs möglicherweise einen Einfluss auf die Aufhängung des Selektivitätsfilters im Gesamtprotein haben können, ist es durchaus möglich, dass die TMs in einer indirekten Art und Weise die Fein-Struktur der Filterregion beeinflussen. Genau dies konnte auch in Kcv_{PBCV-1} beobachtet werden. Dieser zeigt eine ähnliche Leitfähigkeit für Rb⁺ und K⁺ wie Kmpv_{SP1}, denn er leitet K⁺ besser als Rb⁺ (K⁺>Rb⁺). Kcv ähnliche Kanäle, die aus dem *Chlorella viruse* isoliert wurden und sich in vier bis zwölf Aminosäuren von Kcv_{PBCV-1} unterscheiden, zeigen alle eine Funktionalität nach Expression in *X. laevis* Oozyten. Dennoch unterscheiden sie sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften vom Referenzkanal Kcv_{PBCV-1}. So zeigt MA-1D Kcv_{PBCV-1} eine wesentlich höhere Leitfähigkeit für Rb⁺ als K⁺, wie Kmpv₁. MA-1D Kcv_{PBCV-1} unterscheidet sich in nur fünf Aminosäuren von Kcv_{PBCV-1}, welche in der ersten TM und in der Poren-Helix liegen. Nach Substitution der Aminosäure Valin an der Stelle 19 in der ersten TM zu Phenylalanin, wie an äquivalenter Stelle in Kcv_{PBCV-1}, ist die Leitfähigkeit für K⁺ größer als für Rb⁺. Somit besitzt die erste TM auch in diesem Kanal einen Einfluss auf die Rb⁺-Leitfähigkeit (Gazzarrini *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). Auch Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ weisen in ihrer Aminosäure-Sequenz die zwei Aminosäuren Valin und Phenylalanin an entsprechenden Stellen auf. Allerdings besitzt Kmpv₁ (Rb⁺>K⁺) an diesen Stellen (4 und 77) immer ein Valin und Kmpv_{SP1} (K⁺>Rb⁺) an äquivalente Stelle ein Phenylalanin (Abbildung 3.25). Die Korrelation

zwischen Kationenselektivität und Aminosäure ist bei den Kmpv-Kanälen demnach invers zu der in den Kcv Kanälen. Dennoch ist ein Einfluss der Aminosäuren, an den oben genannten Stellen, möglich, dies wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Cs^+ auf die beiden viralen K^+ -Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ untersucht. Hierfür wurden sie nach Expression in HEK293-Zellen mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik in der *whole-cell*-Konfiguration gemessen. In die externe Lösung wurden zunächst 1 mM und anschließend 10 mM Cs^+ hinzugefügt. Beide virale K^+ -Kanäle zeigen eine Reduktion des Einstroms. Bereits 1977 konnte Gay und Stanfield zeigen, dass der einwärtsgerichtete K^+ -Kanal aus dem Sartorius-Muskel aus *Rana temporaria* eine Sensitivität für Cs^+ aufweist und der Einstrom in Anwesenheit von Cs^+ geblockt wird (Gay und Stanfield, 1977). Allerdings sind innerhalb der großen Familie der K^+ -Kanäle deutliche Unterschiede in der Sensitivität für Cs^+ zu erkennen: So zeigen einige K^+ -Kanäle eine sehr hohe Sensitivität für Cs^+ und andere eine geringere Sensitivität (Cecchi *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 2015). Aber auch innerhalb der Kcv-Kanäle ist eine ähnliche Variabilität der Cs^+ -Sensitivität zu beobachten (Gazzarrini *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004).

Gleiches gilt für die Kmpv-Kanäle: So zeigt Kmpv_{SP1} eine wesentlich höhere Cs^+ -Sensitivität im Vergleich zu Kmpv₁. Der mittlere Block bei einer Referenzspannung von -100 mV und einer Cs^+ -Konzentration von 10 mM in einer 50 mM K^+ -Lösung (extern) liegt in Kmpv_{SP1} bei $78 \pm 0,3\%$ (n=6), im Vergleich dazu liegt der Cs^+ -Block in Kmpv₁ bei gleichen Bedingungen nur bei $32 \pm 0,7\%$ (n=10) und ist somit 2,5-fach niedriger (Abbildung 3.18). Um herauszufinden welche Struktur des viralen K^+ -Kanals Kmpv_{SP1} für die höhere Cs^+ -Sensitivität im Vergleich zu Kmpv₁ verantwortlich ist, wurde die Chimäre, bestehend aus der ersten und zweiten TM von Kmpv_{SP1} und der Porenregion aus Kmpv₁ (TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁), unter gleichen Bedingungen, wie Kmpv_{SP1} und Kmpv₁, untersucht. Wie im Falle der Rb^+ Leitfähigkeit sollen die Daten zeigen, ob die Porenregion oder die TMs für die hohe Sensitivität für Cs^+ verantwortlich sind. In dem Fall, dass die TMs für die Sensitivität verantwortlich sind, würde die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ eine gleich hohe Cs^+ -Sensitivität aufweisen wie der Wildtyp-Kanal Kmpv_{SP1}. Die Ergebnisse zeigen, dass die verantwortliche Struktur für die hohe Cs^+ -Sensitivität in der Tat mit den TMs verknüpft sein muss. So zeigt die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁, bei gleichen Bedingungen wie oben, einen mittleren Block von $82 \pm 0,4\%$ (n=6); Dies entspricht dem Wildtyp-Kanal Kmpv_{SP1}. Die Daten zeigen, dass sowohl die höhere Cs^+ -Sensitivität als auch die hohe Rb^+ -Leitfähigkeit auf die TMs zurückzuführen sind.

Für andere K⁺-Kanäle sind die Bindestellen für Rb⁺ und Cs⁺ im Kanalprotein bereits bekannt. Sie liegen in MthK, KcsA und NaK2K innerhalb der Filterdomäne. So bindet Rb⁺ in allen drei genannten Kanälen direkt im Selektivitätsfilter in den Positionen S1, S3 und S4 und reduziert so den K⁺-Strom (Lam *et al.*, 2014). Hingegen bindet Cs⁺ in NaK2K überwiegend in S1 und S3, und in KcsA zusätzlich noch in S4 (Lam *et al.*, 2014). Die vorliegenden Daten schließen nicht aus, dass Cs⁺ auch in den Kmpv-Kanälen im Filter bindet. Eine solche Lokalisation würde erklären, warum der Cs⁺-Block eine so ausgeprägte Spannungsabhängigkeit aufweist (Abbildung 3.9 und 3.19). Da die Spannung in einem K⁺-Kanal vor allem über der Filterregion abfällt, kann der spannungsabhängige Block eigentlich nur dadurch erklärt werden, dass Cs⁺ in dem elektrischen Feld in den Filter gezogen wird, wo es dann den K⁺-Strom inhibiert. Wenn man beide Umstände, die Spannungsabhängigkeit des Blocks und den Einfluss der TMs auf die Cs⁺-Empfindlichkeit, berücksichtigt, muss man zu dem Schluss kommen, dass die TMs die Aufhängung des Selektivitätsfilters beeinflussen und dass es dadurch zu einer unterschiedlichen Feinstruktur des Selektivitätsfilters kommt. Dies hat dann einen Einfluss auf die Rb⁺-Leitfähigkeit und Cs⁺-Sensitivität in den beiden Modellkanälen Kmpv_{SP1} und Kmpv₁.

Bereits andere Studien konnten zeigen, dass die Rb⁺-Leitfähigkeit und Cs⁺-Sensitivität in einem K⁺-Kanal aufgehoben wird, wenn im Kir2.1 die Aminosäure Serin an Stelle 165 durch die Aminosäure Leucin substituiert wird (Abbildung 4.1). Durch die Substitution zeigt Kir2.1 S165L eine wesentlich höhere Rb⁺-Leitfähigkeit und einen geringeren Block durch Cs⁺, im Vergleich zum Wildtyp-Kanal. Diese Stelle befindet sich ebenfalls in den TMs, genauer in der zweiten TM; sie trägt zur Stabilisierung des Selektivitätsfilters des K⁺-Kanals, vermutlich durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Serin (165) und dem Threonin (141) bei (Thompson *et al.*, 2000). Vergleicht man die Aminosäure-Sequenz des Kir2.1 an Stelle 165 mit denen der viralen K⁺-Kanäle Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} an entsprechender Stelle, so fällt auf, dass weder Kmpv₁ noch Kmpv_{SP1} ein Serin an dieser Stelle besitzen (Abbildung 4.1). An der entsprechenden Stelle sind die Aminosäuren Phenylalanin (Kmpv_{SP1}) und Valin (Kmpv₁), welche aufgrund einer fehlenden OH-Gruppe nicht in der Lage sind eine Wasserstoffbrückenbindung einzugehen. Da beide viralen K⁺-Kanäle nicht die Möglichkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke besitzen, scheint dieser Mechanismus anders als bei Kir-Kanälen keinen Einfluss auf die unterschiedliche Cs⁺-Sensitivität und Rb⁺-Leitfähigkeit zu besitzen. Es ist aber durchaus möglich, dass dieser Mechanismus, in dem der Selektivitätsfilter durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird, auch auf die unterschiedlichen Sensitivitäten und Leitfähigkeiten in Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ zurückzuführen ist, aber eine andere Aminosäure hierfür verantwortlich ist. Dies wurde hier nicht weiter untersucht.

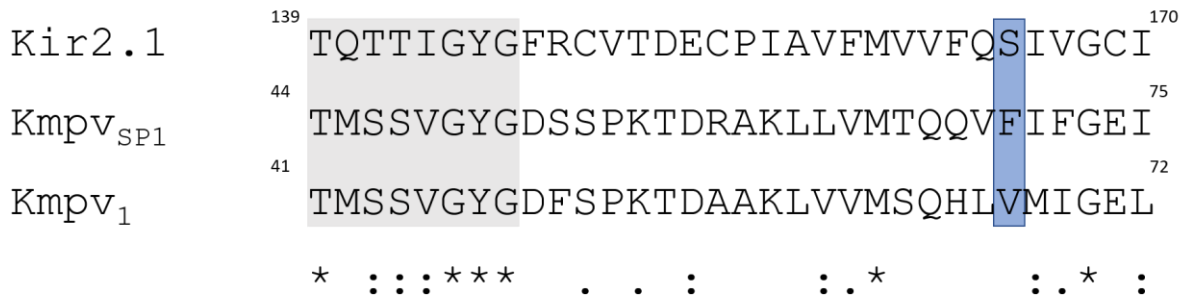


Abbildung 4.1: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der K⁺-Kanäle Kir2.1, Kmpv_{SP1} und Kmpv₁. Dargestellt ist das Alignment der Aminosäure-Sequenzen der beiden viralen K⁺-Kanälen Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} und des einwärtsgerichteten K⁺-Kanals Kir2.1. Der Selektivitätsfilter ist in grau hinterlegt. In blau ist die Aminosäure Serin an Stelle 165 in Kir2.1 im Vergleich zu Kmpv_{SP1} (Phenylalanin) und Kmpv₁ (Valin) markiert. Sterne markieren gleiche, Punkte und Doppelpunkte konservierte und semikonservierte Aminosäuren.

Insgesamt wird die Hypothese bezüglich einer Positionierung des Filters durch andere Bereiche im Protein jedoch auch die kürzlich publizierte Struktur des HCN1 Kanals unterstützt. HCN-Kanäle weisen die gleiche Aminosäure-Sequenz im Filter auf wie andere Kanäle, haben aber trotzdem eine geringere K⁺/Na⁺-Selektivität als andere K⁺-Kanäle. Aus der HCN1 Struktur geht nun hervor, dass auch Aminosäuren außerhalb des Filters für die direkte Orientierung der kritischen Carboxylreste im Filter und damit für die Selektivität verantwortlich sein können (Lee und MacKinnon, 2017).

Aber auch die erste TM kann in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Cs⁺-Sensitivität eine Rolle spielen. So weist die MA-1D Kcv_{PBCV-1} Variante, im Vergleich zum Referenzkanal Kcv_{PBCV-1}, eine hohe Sensitivität für Cs⁺ auf. Der Einstrom von MA-1D Kcv_{PBCV-1} wird nach Expression in Oozyten in Anwesenheit von 10 mM Cs⁺, wie Kmpv_{SP1}, vollständig blockiert. Hingegen zeigt Kcv_{PBCV-1} keinen vollständigen Block in Anwesenheit von Cs⁺, wie bei Kmpv₁. MA-1D Kcv_{PBCV-1} unterscheidet sich allerdings nur in fünf Aminosäuren von Kcv_{PBCV-1}. Diese Unterschiede befinden sich in der ersten TM und in der Poren-Helix. Durch Substitution der Aminosäure Valin durch Phenylalanin an Stelle 19 in MA-1D, kann die Cs⁺-Sensitivität auf das Niveau des Referenzkanals Kcv_{PBCV-1} gesenkt werden. So zeigt MA-1D V19F eine ähnliche Cs⁺-Sensitivität, wie Kcv_{PBCV-1}. Das heißt, die Aminosäure, welche für die unterschiedliche Cs⁺-Sensitivität verantwortlich ist, befindet sich wie bei Kmpv-Kanälen in den TMs, in diesem Beispiel in der ersten TM (Gazzarrini *et al.*, 2004). Wie oben bereits erwähnt, besitzen Kmpv_{SP1} ein Phenylalanin (Stelle 70) und Kmpv₁ an vergleichbarer Stelle ein Valin (Stelle 68) in der zweiten TM (Abbildung 4.1). Allerdings zeigt Kmpv₁ eine niedrigere Cs⁺-Sensitivität als

Kmpv_{SP1}. Bei MA-1D Kcv_{PBCV-1} und Kcv_{PBCV-1} ist es andersrum und der Cs⁺ sensitivere besitzt ein Valin. Aber auch in der ersten TM besitzt Kmpv_{SP1} ein Phenylalanin an der Stelle sieben und Kmpv₁ an äquivalenter Stelle ein Valin. Allerdings wurden bisher beide Punktmutationen nicht auf ihre Rb⁺-Leitfähigkeit und Cs⁺-Sensitivität untersucht.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die sensible Stelle, welche für die Rb⁺-Leitfähigkeit und die Cs⁺-Sensitivität verantwortlich ist, in den TMs liegen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese mit der Porenregion interagieren und somit die Feinstruktur des Selektivitätsfilters direkt verändern. Solche Interaktionen konnte auch Gazzarrini nachweisen, denn bei der Kcv-Variante MA-1D führte eine Mutation, wie bereits erwähnt, in der ersten TM (V19F) zu einer geringeren Cs⁺-Sensitivität. Jedoch zeigt die Doppelmutante MA-1D Kcv_{PBCV-1} V19F L54I einen fast vollständigen Block durch Cs⁺ und hebt somit den Effekt der Substitution von Valin zu Phenylalanin, an Stelle 19, auf. Die Stelle 54 befindet sich in der Poren-Helix und deutet darauf hin, dass die erste TM indirekt mit der Porenregion verbunden ist (Gazzarrini *et al.*, 2004).

4.2. Die Bariumbindestelle

Ba²⁺ ist ein typischer K⁺-Kanalblocker und weist eine ähnliche Größe wie K⁺ auf. Deshalb passt Ba²⁺ in den Selektivitätsfilter der K⁺-Kanäle. Aufgrund der zweiwertigen positiven Ladung kommt es dort zu einer stärkeren Bindung und als Folge daraus zu einem Block des K⁺-Stroms (Jiang *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ auf ihre Ba²⁺-Sensitivität untersucht. Hierfür wurden sie als Fusionsprotein mit EGFP in HEK-293 Zellen exprimiert und anschließend mit der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration bei verschiedenen externen Ba²⁺-Konzentrationen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Kmpv₁ als auch Kmpv_{SP1} eine Sensitivität für Ba²⁺ aufweisen (Abbildung 3.13). Jedoch ist Kmpv_{SP1}, mit einem K_D-Wert von 13 μ M bei einer Referenzspannung von -100 mV, im Vergleich zu Kmpv₁, mit einem K_D-Wert von 945 μ M, fast zwei Größenordnungen sensitiver für Ba²⁺ (Abbildung 3.13 D). Bereits Siotto konnte zeigen, dass es bei dem viralen K⁺-Kanal Kmpv₁ nach Zugabe von 10 mM Ba²⁺ (externe Lösung) nicht zu einem vollständigen Block des Einstromes kommt (Siotto, 2017). Dennoch zeigen beide viralen K⁺-Kanäle eine starke Spannungsabhängigkeit des Ba²⁺ Blocks, was auch bereits bei anderen K⁺-Kanälen beobachtet werden konnte. So zeigten Standen und Stanfield 1977, dass der Ba²⁺-Block in einwärtsgerichtenden K⁺-Kanälen im Froschmuskel stark spannungsabhängig sind (Standen und Stanfield, 1977). Der virale K⁺-

Kanal Kmpv_{SP1} ist ähnlich sensitiv für Ba²⁺ wie es für Kir-Kanäle bekannt ist (Hibino *et al.*, 2010). So liegt der K_D-Wert z.B. bei Kir2.3, bei einer Referenzspannung von -100 mV und einer externen K⁺-Konzentration von 60 mM, bei 10,3 μ M nach Expression in *Xenopus* Oozyten (Xin Liu *et al.*, 2001). Dies entspricht ungefähr dem K_D-Wert von Kmpv_{SP1}, der in einer externen 50 mM K⁺-Lösung bei -100 mV einen K_D-Wert von 13 μ M aufweist. Bei K⁺-Kanälen ist außerdem bekannt, dass der Ba²⁺-Block abhängig von der K⁺-Konzentration ist, so ist für die gleiche halbmaximale Inhibierung bei höheren K⁺-Konzentrationen eine höhere Ba²⁺-Konzentration notwendig. So liegt der K_D-Wert z.B. im Falle von Kir2.1 bei einer K⁺-Konzentration von 60 mM nur bei 3,2 μ M. Eine Erhöhung der K⁺-Konzentration auf 96 mM reduziert die Affinität auf 8 μ M (Hibino *et al.*, 2010). Dies wurde bei den viralen K⁺-Kanälen Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} bisher nicht untersucht.

Um herauszufinden welche Struktur für die unterschiedliche Ba²⁺-Sensitivität der beiden viralen K⁺-Kanäle Kmpv₁ und Kmpv_{SP1} verantwortlich ist, wurde die Chimäre, bestehend aus den TMs aus Kmpv_{SP1} und der Porenregion aus Kmpv₁ (TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁), untersucht. Die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ zeigt nach Expression in HEK-293 Zellen eine deutlich verringerte Ba²⁺-Sensitivität (Abbildung 3.14). Das zeigt, dass anders als im Falle von Cs⁺, die Filterdomäne direkt für die Ba²⁺-Sensitivität verantwortlich sein muss. Bei Betrachtung der K_D-Werte der Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁ im Vergleich zu Kmpv_{SP1} wird deutlich, dass dieser bei einer Spannung von -100 mV um das 168-fache höher liegt; der Wert ist sogar noch 2,3-fach höher als bei Kmpv₁ (Abbildung 3.14 D). Um genauere Einblicke in die Ba²⁺-Sensitivität zu erhalten und die genaue verantwortliche Struktur zu identifizieren, wurde eine weitere Punktmutation zwei Aminosäuren hinter dem GYG-Motiv im Filter durchgeführt und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration untersucht. In der Mutation wurde in Kmpv_{SP1} die Aminosäure Serin an Stelle 53 gegen Phenylalanin substituiert. Diese Aminosäure wurde gewählt, weil Kmpv₁ an der vergleichbaren Stelle diese Aminosäure aufweist. Die elektrischen Eigenschaften der Mutante zeigen, dass der Aminosäureaustausch S53F in Kmpv_{SP1} die Affinität des Kanals für Ba²⁺ reduziert. Die Mutante hat den gleichen halbmaximalen Wert für den Ba²⁺-Block wie der unempfindliche Wildtyp-Kanal Kmpv₁ (Abbildung 3.16).

Bei anderen K⁺-Kanälen ist die Bindestelle für Ba²⁺ im Kanalfilter bereits gut untersucht. Die meisten K⁺-Kanäle besitzen eine oder mehrere Ba²⁺-Bindestellen im Selektivitätsfilter. So konnte z.B. in KcsA die Positionen S2 und S4 im Filter (Piasta *et al.*, 2011) und in MthK die Positionen S3 und S4 als Ba²⁺-Bindestellen nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2014). Auch der einwärtsgerichtete K⁺-Kanal Kir2.1 zeigt nach Austausch der Aminosäure Threonin zu

Serin an Stelle 142, d.h. in S4, eine deutliche Resistenz für Ba^{2+} (Abbildung 4.2) (Chatelain *et al.*, 2005). Ähnliches gilt für den viralen K^+ -Kanal $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$; auch dieser Kanal zeigt nach Substitution der Aminosäure Threonin zu Serin an Stelle 63, welche der Stelle 142 in Kir2.1 entspricht, eine stark verminderte Ba^{2+} Empfindlichkeit auf. Während der Wildtyp-Kanal $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$ in Anwesenheit von 1 mM Ba^{2+} fast vollständig blockiert wird, zeigt die $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$ T63S Mutante unter den gleichen Bedingungen lediglich eine halbmaximale Inhibierung. Für einen vollständigen Block ist eine 10-fach höher Ba^{2+} -Konzentration notwendig (Chatelain *et al.*, 2009). In Abbildung 4.2 A ist ein Alignment der Aminosäure-Sequenzen der betreffenden Region des Kir2.1, KcsA, MthK, $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$, Kmpv_{SP1} und Kmpv_1 im Vergleich dargestellt. Hier wurde jeweils die Position S4 in blau und die sensible Stelle 53 in Kmpv_{SP1} in rot gekennzeichnet. In Abbildung 4.2 B ist ein Homologiemodell der zwei Untereinheiten des Kmpv_{SP1} dargestellt. Hier wurde die entsprechende Ba^{2+} -Bindestelle aus KcsA, MthK, Kir2.1 und $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$ in blau, die sensible Stelle 53 des Kmpv_{SP1} in magenta und der Selektivitätsfilter in grün markiert. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt. Alle genannten K^+ -Kanäle, außer Kmpv_1 und Kmpv_{SP1} , zeigen, dass die Aminosäure Threonin zwei Aminosäuren vor dem GYG-Motiv (Abbildung 4.2 A und B, blau) zur Veränderung der Sensitivität für Ba^{2+} , wie z.B. bei Kir2.1 und $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$, beiträgt (Chatelain *et al.*, 2005; Chatelain *et al.*, 2009). Kmpv_{SP1} und Kmpv_1 weisen an dieser entsprechenden Stelle allerdings ein Serin und kein Threonin auf. Bei Kmpv_1 , welcher durch Ba^{2+} nicht vollständig geblockt wird, wurde die entsprechende Stelle 43 bereits auf ihren Beitrag zur Ba^{2+} -Sensitivität untersucht. Entsprechend von publizierten Daten wurde vermutet, dass durch den Austausch der Aminosäure Serin zu Threonin der Einstrom so wie bei $\text{Kcv}_{\text{PBCV-1}}$ durch Ba^{2+} vollständig blockiert wird (Chatelain *et al.*, 2009). Allerdings hat diese Substitution (S43T) in Kmpv_1 keinerlei Einfluss auf die Ba^{2+} -Sensitivität; auch die Mutante Kmpv_1 S43T zeigte keinen vollständigen Block in Anwesenheit von hohen Ba^{2+} -Konzentrationen. Bei einer Referenzspannung von -100 mV und einer Ba^{2+} -Konzentration von 10 mM wurde die Mutante nur um 60% geblockt (Siotto, 2017). Allerdings zeigt die Doppelmutante Kmpv_1 S43/44T bei gleichen Bedingungen einen fast vollständigen Block (Siotto, 2017). Die entsprechenden Experimente wurden bisher jedoch noch nicht für Kmpv_{SP1} durchgeführt, weil sowohl Kmpv_1 als auch Kmpv_{SP1} ein Serin an der zweiten und dritten Aminosäure vor dem GYG-Motiv (Abbildung 4.2) besitzen. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass die unterschiedliche Ba^{2+} -Sensitivität darauf zurückzuführen ist. Diese Hypothese wird durch Experimente in der vorliegenden Arbeit unterstützt. Diese zeigen, dass eine Stelle an der Außenseite der Filterdomäne für die Ba^{2+} -Sensitivität in den Kmpv -Kanälen

Kmpv_{SP1} besser als in Kmpv₁ und der Mutante Kmpv_{SP1} S53F zugänglich. Vermutlich hat Kmpv_{SP1} daher eine höhere Sensitivität für Ba²⁺ als Kmpv₁ und der Mutante Kmpv_{SP1}S53F.

4.3. Die Einwärtsgleichrichtung

Einwärtsgleichrichtende K⁺-Kanäle wurden bereits 1949 in Skelettmuskeln identifiziert (Katz, 1949), sie leiten vor allem K⁺ bei Spannungen, die negativer als das Gleichgewichtspotential für K⁺ liegen, in die Zelle hinein, als bei positiven Spannungen. Diese elektrophysiologische Eigenschaft wurde hier auch für den viralen K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} erstmalig beschrieben.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde versucht den Mechanismus, welcher für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist, aufzuklären. Hierfür wurde Kmpv_{SP1} zunächst in einem zellfreien System mit Hilfe der planaren Lipid-Bilayer Technik untersucht. Denn bei Kir-Kanälen ist bekannt, dass die Einwärtsgleichrichtung auf einen intrazellulären Block des Ausstroms durch Kationen wie z.B. Mg²⁺ oder Polyamine wie z.B. Spermidin zurückzuführen ist (Lopatin *et al.*, 1995; Matsuda *et al.* 1987; Fakler *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995). Offensichtlich ist dieser Mechanismus der Gleichrichtung bei dem viralen K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} nicht dafür verantwortlich, dass er nur Einwärtsstrom leitet. Der Kanal zeigt auch in einer reinen K⁺-Lösung eine eindeutige Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 3.4), welche selbst nach Zugabe von 1 mM EDTA in die *cis*- und *trans*-Kammer, um zweiwertige Kationen zu komplexieren, stabil vorhanden bleibt (Abbildung 3.4 C, D und E). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von HEPES die Einwärtsgleichrichtung von Kir-Kanälen beeinflusst. So zeigt der einwärtsgleichrichtende K⁺-Kanal IRK1 eine Abhängigkeit der Einwärtsgleichrichtung von der HEPES-Konzentration: Je höher die HEPES-Konzentration, desto stärker ist die Einwärtsgleichrichtung (Guo und Lu, 2000). Auch dieser Mechanismus kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse als Grund für die Einwärtsgleichrichtung bei Kmpv_{SP1} ausgeschlossen werden. Wie oben erwähnt, findet man in dem sehr reduzierten Messsystem der planaren Lipid-Bilayer Technik bei Kmpv_{SP1} selbst in einer reinen K⁺-Lösung in Abwesenheit von HEPES eine deutliche Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 3.4 A und E). Die Summe dieser Befunde legt nahe, dass es sich bei dem viralen K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} um ein Protein handeln muss, bei dem die Gleichrichtung durch intrinsische Strukturfaktoren bedingt wird. Der virale Kanal zeigt zwar phänotypisch die gleichen gleichrichtenden Eigenschaften wie Kir-Kanäle, der Mechanismus, der für diese Spannungsabhängigkeit verantwortlich ist muss aber anders sein als bei den gut untersuchten Kir-Kanälen (Hibino *et al.*, 2010).

Trotz der offensichtlichen Unterschiede im Gatingmechanismus verhält sich Kmpv_{SP1} in mehreren Hinsichten wie Kir-Kanäle. So besitzt Kmpv_{SP1} auch eine sehr hohe Sensitivität für Ba²⁺. Wie die vorliegenden Daten zeigen, ist diese hohe Ba²⁺ Empfindlichkeit nicht typisch für virale K⁺-Kanäle. Der strukturell sehr ähnliche K⁺-Kanal Kmpv₁, der kein Gleichrichter ist, hat z.B. eine viel geringere Affinität für Ba²⁺ als Blocker.

Wie bereits erwähnt, haben die Kir-Kanäle und der Kmpv_{SP1} auch eine phänotypische Gemeinsamkeit in Bezug auf die extrazelluläre K⁺-Konzentration. Auf Veränderung der externen K⁺-Konzentration reagiert Kmpv_{SP1} ganz ähnlich wie Kir-Kanäle. Neben dem Umkehrpotential verschiebt sich in beiden Fällen mit Veränderung der externen K⁺-Konzentration auch die Einwärtsleitfähigkeit: Bei den meisten Kir-Kanälen kann beobachtet werden, dass die Einwärtsleitfähigkeit mit zunehmender K⁺-Konzentration steigt und diese abhängig von der Quadratwurzel der externen K⁺-Konzentration ist (Hagiwara und Takahashi, 1974; Lopatin *et al.*, 1996; Makhina *et al.*, 1994; Perier *et al.*, 1994; Sakmann und Trube und Hescheler, 1984). Dies führt dazu, dass unabhängig von der K⁺-Konzentration in der externen Lösung immer ein signifikanter Einwärtsstrom gewährleistet ist. Ohne diese Spannungsabhängigkeit würde der Kanal bei sehr niedrigen K⁺-Konzentrationen auch Auswärtsstrom leiten. Nach Auftragung der Leitfähigkeit gegen die externe K⁺-Konzentration von Kmpv_{SP1} und durch den Fit der Messpunkte mit Gleichung 3.4 (Perier *et al.*, 1994) ergibt sich für Kmpv_{SP1}, dass die Leitfähigkeit mit einem Faktor von 0,36 eine annähernde Kubikwurzelabhängigkeit zur externen K⁺-Konzentration aufweist (Abbildung 3.3 B). Die Einwärtsleitfähigkeit von Kmpv_{SP1} ist, nicht wie bei den Kir-Kanälen abhängig von der Quadratwurzel der externen K⁺-Konzentration, sondern der Kubikwurzel der externen K⁺-Konzentration abhängig. Außerdem ist zu beobachten, dass sich das Umkehrpotential bei zunehmender K⁺-Konzentration in den positiven Spannungsbereich verschiebt, wie das für K⁺-Kanäle zu erwarten ist (Abbildung 3.3 A).

Um den Mechanismus der Gleichrichtung in Kmpv_{SP1} zu verstehen, wurde Kmpv₁, welcher eine lineare K⁺-Leitfähigkeit zeigt, als Referenzprotein herangezogen. Die Idee war, dass sich die unterschiedlichen Spannungsabhängigkeiten der K⁺-Kanäle auf die geringen strukturellen Unterschiede in den beiden Proteinen zurückzuführen lassen sollten. Um die Anzahl der kritischen Aminosäuren weiter einzuengen, wurde ein weiterer viraler K⁺-Kanal, welcher aus dem *Micromonas pusilla virus PL1* isoliert wurde, herangezogen. Kmpv_{PL1} stimmt in der Aminosäure-Sequenz zu 72% mit Kmpv_{SP1} überein und zeigt nach Rekonstitution in einen planaren Lipid-Bilayer ebenfalls eine deutliche Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 3.28). In

einem Alignment der drei viralen K⁺-Kanäle Kmpv_{V1}, Kmpv_{VSP1} und Kmpv_{VPL1} wurden alle Aminosäuren markiert, in denen Kmpv_{VSP1} und Kmpv_{VPL1} (Einwärtsgleichrichter) die gleiche, aber Kmpv_{V1} (symmetrische K⁺-Leitfähigkeit) eine unterschiedliche Aminosäure aufweisen (Abbildung 3.29 und 32). Anschließend wurden die jeweiligen Aminosäuren ausgehend von Kmpv_{VSP1} als parentalem Protein zur entsprechenden Aminosäure des Kmpv_{V1} mutiert. Die Funktionalität der Mutanten wurde dann mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell*-Konfiguration untersucht. Aufgrund früherer Untersuchungen, welche in dieser Arbeit nochmal bestätigt werden konnten, war bereits bekannt, dass die Porenregion nicht für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich ist. Denn eine Chimäre TM1+2 Kmpv_{VSP1}/ Loop Kmpv_{V1}, bestehend aus der ersten und zweiten TM von Kmpv_{VSP1} und der Porenregion von Kmpv_{V1}, zeigt immer noch eine deutliche Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 6.25). Daraus kann geschlossen werden, dass die Pore trotz ihrer funktionellen Unterschiede (Kapitel 6.3) nicht für die Spannungsabhängigkeit des K⁺-Kanals verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden als mögliche Ursache für die Gleichrichtung nur einzelne Aminosäure-Unterschiede zwischen den K⁺-Kanälen innerhalb der TMs näher betrachtet. Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass die Gleichrichtung des Kanals sehr robust ist; nur eine von 22 Punktmutationen führt zu einem K⁺-Kanal, der nur noch wenig Strom leitet, aber keine deutliche Einwärtsgleichrichtung mehr zeigt. Bei dieser Mutante weist Kmpv_{VSP1} an der Stelle 72, welche sich in der zweiten TM befindet, ein Phenylalanin auf. Nach Substitution der Aminosäure Phenylalanin zu Isoleucin, wie an entsprechender Stelle in Kmpv_{V1}, zeigt sich eine lineare K⁺-Leitfähigkeit (Abbildung 3.36). Allerdings zeigt Kmpv_{VSP1} F72I insgesamt viel weniger Strom als Kmpv_{VSP1} und Kmpv_{V1}. Einzelkanalmessungen der Mutanten im Lipid-Bilayer bestätigen, dass die Mutation einen Einfluss auf das Kanalschalten hat. Die Messungen zeigen, dass die Mutante, anders als der Wildtyp-Kanal, auch bei positiven Spannungen Einzelkanalschalttereignisse aufweist. Die Eliminierung der aromatischen AS in der *Cavity* scheint demnach das Schaltverhalten des Kanals zu beeinflussen. Betrachtet man jedoch den zeitgemittelten Strom, der sich aus der Einzelkanalamplitude und der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals berechnet, so stellt man fest, dass die Mutante immer noch ein Einwärtsgleichrichter ist. Aufgrund der hohen Offenwahrscheinlichkeit im negativen Spannungsbereich ist der zeitgemittelte Strom im negativen Spannungsbereich deutlich höher als im positiven Spannungsbereich (Abbildung 3.36 und 6.37). Jedoch fällt bei den Einzelkanalmessungen auf, dass die Offenwahrscheinlichkeit erst ab einer Spannung von -180 mV über 50% liegt, bei positiveren Spannungen als -180 mV liegt die Offenwahrscheinlichkeit bei etwa 20% (Abbildung 3.37). Dies spiegelt sich auch in der zeitgemittelten Strom-Spannungskurve wieder, denn bei Spannungen bis -100 mV liegt der zeitgemittelte Einstrom unter 0,1 pA (Abbildung 3.38) und

sie verläuft bei Spannungen zwischen -120 mV und 200 mV linear. Die makroskopischen Ströme wurden nur bei Spannungen zwischen -120 und 80 mV ermittelt, dies könnte erklären, weshalb es hier nach einer ohmschen Leitfähigkeit aussieht. Es wäre sinnvoller die Mutante Kmpv_{SP1} F72I auch bei negativeren Spannungen als -120 mV zu betrachten, dann wäre vermutlich der Einstrom größer und wäre ein Einwärtsgleichrichter. Dies wurde allerdings in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Bei Betrachtung des Homologiemodells von Kmpv_{SP1}, welches mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt wurde, zeigt sich, dass das Phenylalanin unterhalb des Selektivitätsfilters im Bereich der *Cavity* sitzt. Phenylalanin ragt zur benachbarten Untereinheit und nicht in die *Cavity* hinein (Abbildung 4.3 A). So kommen sich die Phenylalanine der benachbarten Untereinheit sehr nah und haben nur einen Abstand von 8,61 Å.

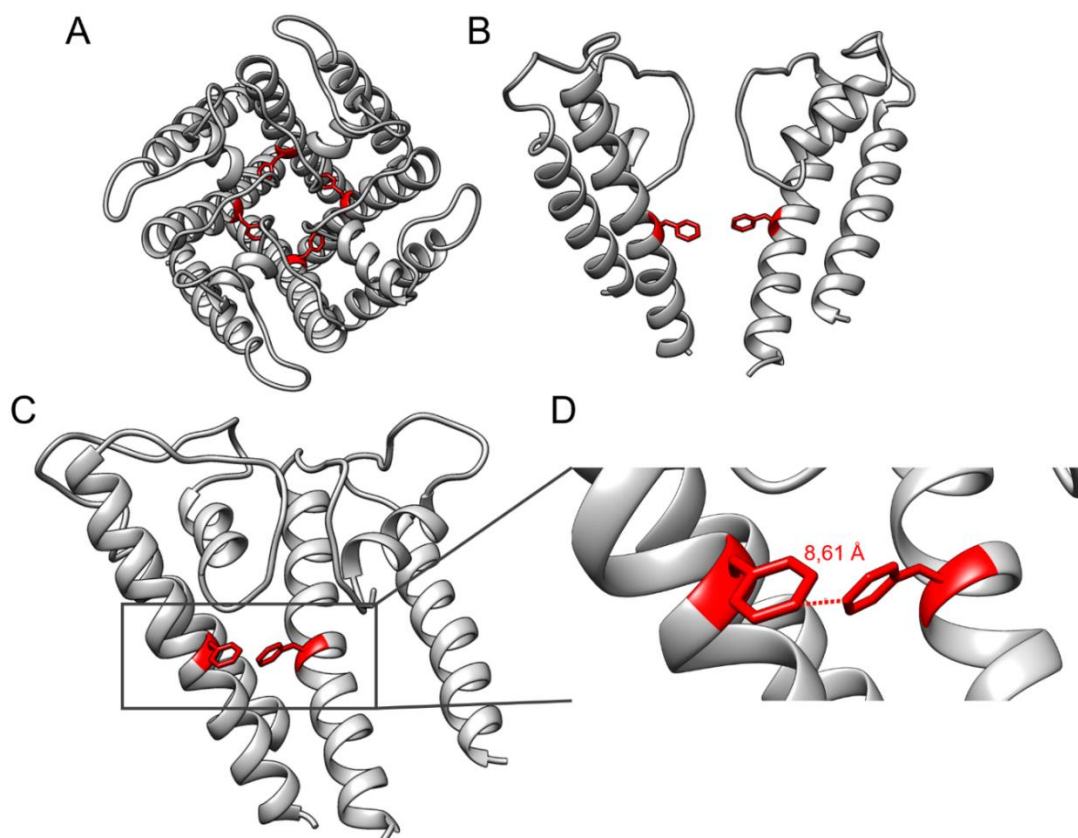


Abbildung 4.3: Homologiemodell des Kmpv_{SP1}. Darstellung von Kmpv_{SP1} mit der Aminosäure Phenylalanin an Stelle 72 in rot als Tetramer in Aufsicht von der extrazellulären Seite (A) und in seitlicher Ansicht von zwei gegenüberliegenden Untereinheiten (B). C zeigt die seitliche Ansicht zweier benachbarter Untereinheiten und D eine Vergrößerung aus C. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt.

Zunächst wurde vermutet, dass es durch die aromatische Aminosäure Phenylalanin zu π -Interaktionen mit K^+ kommen könnte. Daraus könnte sich in der *Cavity* des K^+ -Kanals eine Ionenwolke bilden, die den freien Ionenfluss unterbricht; dies könnte z.B. die Abhängigkeit des Phänomens von der treibenden Kraft für K^+ erklären (Hibino *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2016). Nach den experimentellen Ergebnissen erscheint dieses Modell als Erklärung für die Gleichrichtung allerdings eher unwahrscheinlich. Die *Patch-Clamp* Daten zeigen, dass die Mutante F72A immer noch eine Einwärtsgleichrichtung aufweist (Abbildung 3.39). Auch die Substitution der Aminosäure Phenylalanin durch Leucin hat keinen Einfluss auf die Gleichrichtung (Abbildung 3.39).

Das stärkste Argument gegen eine zentrale Rolle von Phenylalanin in der Gleichrichtung ergibt sich jedoch aus Experimenten, bei denen in dem ähnlich aufgebauten K^+ -Kanal Kmpv_{PL1}, die gleiche Mutation F72I keinen nennenswerten Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit dieses Einwärtsgleichrichters hat. Kmpv_{PL1} F72I ist weiterhin ein deutlicher Einwärtsgleichrichter und zeigt in Einzelkanalmessungen im Vergleich zu Kmpv_{SP1} F72I im positiven Spannungsbereich keine Schaltereignisse.

Eine weitere Untersuchung der Mutante zeigt, dass der Aminosäureaustausch an dieser Stelle nicht ganz ohne Folgen für die Funktion des K^+ -Kanals ist. Die Stromamplitude des Einzelkanals ist im Vergleich zum Wildtyp bei einer Referenzspannung von -100 mV um 40% kleiner (Abbildung 3.28 und 3.38). Trotz der sehr ähnlichen Aminosäure-Sequenz und des gleichen elektrophysiologischen Verhaltens der beiden Wildtyp-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv_{PL1} wird durch diese Ergebnisse deutlich, dass der Austausch nur einer Aminosäure jeweils durch die gleiche Aminosäure Isoleucin zu einem unterschiedlichen elektrophysiologischen Verhalten führt und zeigt wie wichtig der Einfluss einer einzelnen Aminosäure in einem minimalistisch aufgebauten K^+ -Kanal ist.

Wegen der erwarteten Wichtigkeit der TMs für die Gleichrichtereigenschaften des Kmpv_{SP1} Kanals wurde in weiteren Chimären aus Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ nochmals die zweite TM genauer untersucht. Es ist durchaus möglich, dass der Austausch einer Aminosäure alleine nicht ausreicht, um die Einwärtsgleichrichtung zu eliminieren und aus Kmpv_{SP1} einen K^+ -Kanal mit ohmscher Leitfähigkeit zu regenerieren. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Aminosäuren an den Stellen 73-82 in Kmpv_{SP1} keinen Einfluss auf die Gleichrichtung haben. Die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁ zeigt weiterhin eine Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 3.41 E und F). In Abbildung 4.4 A sind die Aminosäure-Sequenzen der beiden Wildtyp-Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ im Vergleich zur Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-2 Kmpv₁ dargestellt. In rot wurden die positiven geladenen Aminosäuren gekennzeichnet. In Abbildung 4.4 B ist das Homologiemodell von

Kmpv_{SP1} als Tetramer von der extrazellulären Seite und in Abbildung 4.4 C nur zwei gegenüberliegende Untereinheiten dargestellt. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt. Es wird deutlich, dass die positiven Aminosäuren am Ende der zweiten TM in den intrazellulären Raum ragen und somit einen Einfluss auf die positiv geladenen Kaliumionen, die den Kanal passieren, haben können. Die geladenen Aminosäuren sind auch dahingehend interessant, als dass man bei einem spannungsabhängigen Prozess wie bei der Gleichrichtung geladene Teilchen benötigt, die das elektrische Feld wahrnehmen. Bei Kv Kanälen z.B. sind das die kationischen Aminosäuren in der vierten TM, die den sogenannten Spannungssensor bilden. Bei Veränderung der Membranspannung kommt es zu einer Verschiebung der TM im elektrischen Feld und als Folge dessen zu einem Öffnen bzw. Schließen des Kanals (Yellen, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die kationischen Aminosäuren am Eingang zur Cavity des K⁺-Kanals, keinen Einfluss auf die Gleichrichtereigenschaften besitzen. Nicht nur der gesamte Austausch der entsprechenden Domäne, sondern auch einzelne Neutralisierungen der geladenen Aminosäuren an den Stellen 83-86 haben keinen Einfluss auf die Schalteigenschaften des Kanals; auch Kmpv_{SP1} Δ83-86 zeigt weiterhin eine Einwärtsgleichrichtung (6.33 und 6.34).

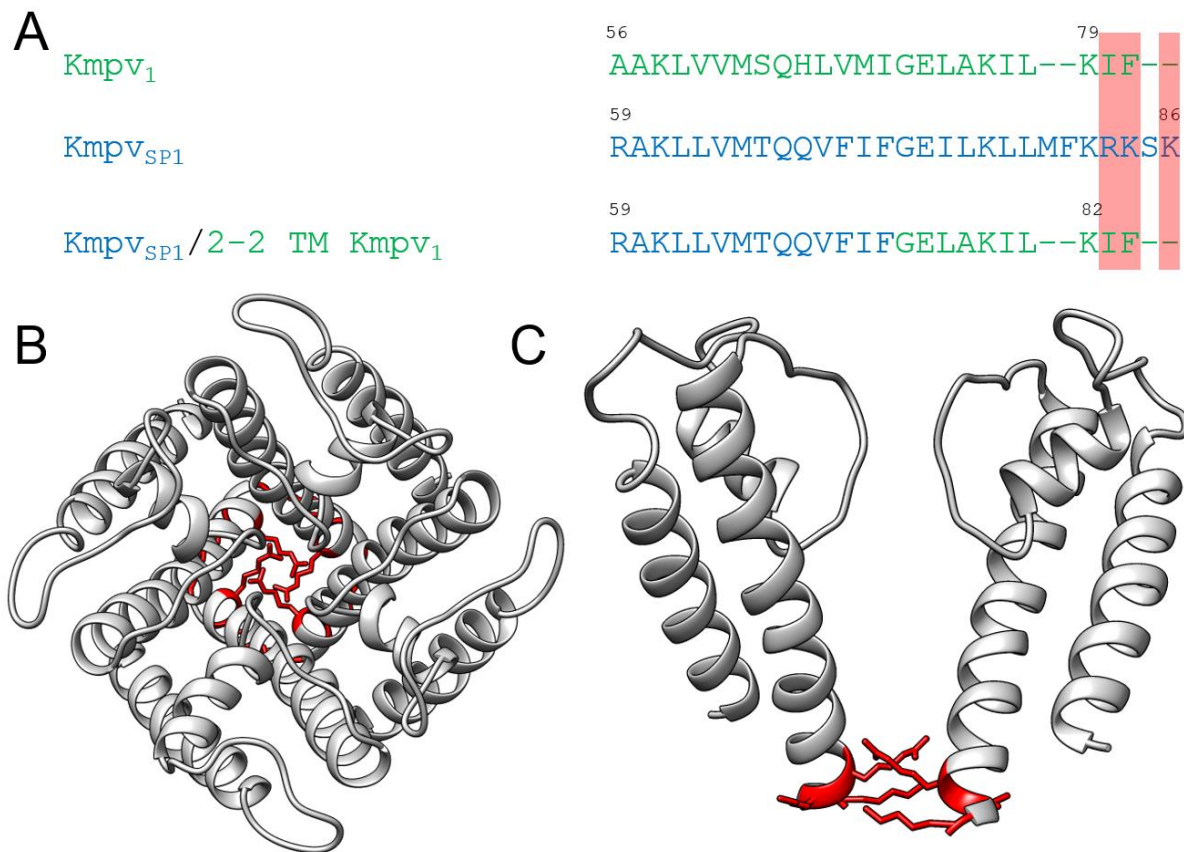


Abbildung 4.4: Die positiven Aminosäuren am intrazellulären Ausgang haben keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung. In A ist ein Alignment der beiden Wildtyp-Kanäle und der Chimäre *Kmpv*_{SP1}/TM2-2 *Kmpv*₁ dargestellt. In B ist das Homologiemodell von *Kmpv*_{SP1} als Tetramer von der extrazellulären Seite dargestellt und in C die seitliche Ansicht zwei gegenüberliegender TMs. In rot wurden jeweils die positiv geladenen Aminosäuren an Stelle 83 bis 86 markiert. Das Homologiemodell wurde mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt.

Allerdings ist auch bekannt, dass der Kir2.1 Kanal eine Einwärtsgleichrichtung aufweist, welche nicht nur auf einen intrazellulären Block des Ausstroms durch Polyamine oder Kationen, sondern auf einen inhärenten Mechanismus zurückzuführen ist. Durch den Austausch der Aminosäure Glutaminsäure zu Glycin in Kir2.1 an der Stelle 224, zeigt dieser eine intrinsische Einwärtsgleichrichtung (Chang *et al.*, 2007). In Kir1.1, der an der äquivalenten Stelle ein Glycin aufweist, zeigt keine intrinsische Einwärtsgleichrichtung. Die Einwärtsgleichrichtung in Kir2.1 wird durch die positiv geladenen Aminosäuren in der Nähe der Aminosäure Glutaminsäure (224) reguliert. Wenn man in Kir1.1 an der entsprechenden Stelle positive Aminosäuren einfügt, so z.B. durch die Substitution des Glycins durch ein Lysin (223), zeigt dieser auch eine ausgeprägte intrinsische Einwärtsgleichrichtung (Chang *et al.*, 2007). Bei Betrachtung eines Alignment von Kir2.1 und *Kmpv*_{SP1} fällt auf, dass es in *Kmpv*_{SP1} keine äquivalente Stelle zu 224

in Kir2.1 gibt, da Kir2.1 viel größer und komplexer aufgebaut ist. Allerdings ist im Homologiemodell von Kmpv_{SP1} zu erkennen, dass der Kanal an der Stelle 74 in der zweiten TM ein Glutamin (grün) und in räumlicher Nähe, am intrazellulären Ausgang, sechs positiv geladene Aminosäuren (blau) besitzt. Im Vergleich dazu zeigt Kmpv₁ nur zwei positiv geladenen Aminosäuren hinter und eine vor dem Glutamin (71) (Abbildung 4.5 B). Aufgrund der Tatsache, dass Kmpv₁ und Kmpv_{PL1} an vergleichbarer Stelle auch ein Glutamin aufweisen, wurde die Auswirkung dieser Aminosäure unter den bisher berücksichtigten Aspekten noch nicht untersucht.

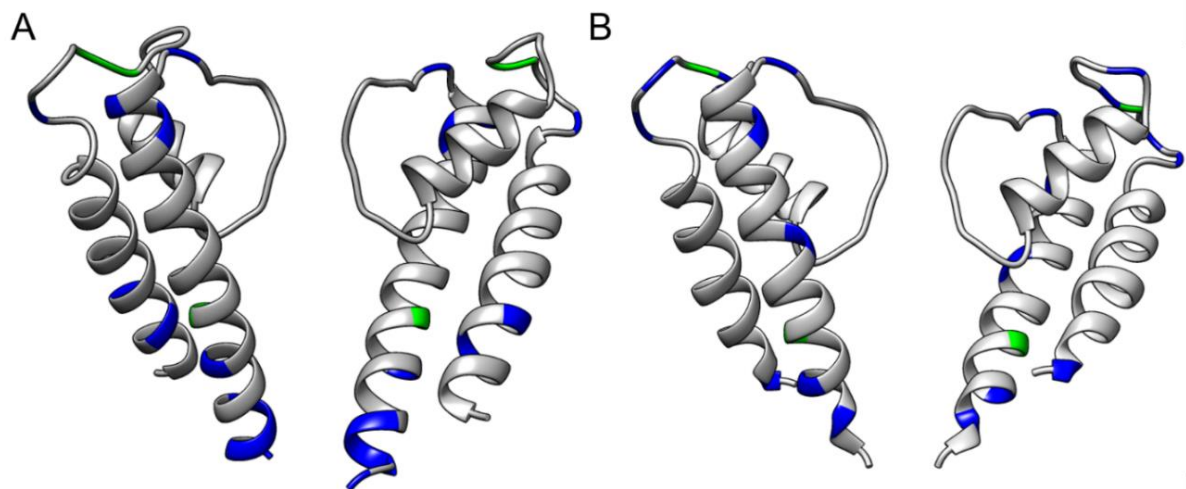


Abbildung 4.5: Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ besitzen an vergleichbarer Stelle ein Glutamin. In A ist die seitliche Ansicht zweier Untereinheiten des Kmpv_{SP1} und in B des Kmpv₁ dargestellt. Die Aminosäuren Glutamin wurden in grün und die positiv geladenen Aminosäuren in blau gekennzeichnet. Die Homologiemodelle wurden mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) und UCSF Chimera 1.11.2, unter Verwendung der Struktur von KirBac 1.1 (PDB code 1P7B, Kuo *et al.*, 2003), erstellt.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Mechanismus für die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv_{SP1} noch nicht vollständig geklärt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Einwärtsgleichrichtung auf einen inhärenten Effekt zurückzuführen ist. Ferner schließen die Daten aus, dass die Gleichrichtereigenschaften durch die unterschiedlichen Selektivitätsfilter definiert werden. Bei einer Analyse der Aminosäuren, in denen sich die funktionell unterschiedlichen Kanäle Kmpv_{SP1} und Kmpv₁ unterscheiden, war es nicht möglich eine einzelne Aminosäure als strukturelle Ursache für die Gleichrichtung zu identifizieren. Mit diesem Ansatz konnte nur die Aminosäure Phenylalanin in Kmpv_{SP1} an der Stelle 72 entdeckt werden, die dazu führt, dass man in Einzelkanalanalysen einzelne Schaltereignisse auch im positiven Spannungsbereich sieht. Dieser Befund deutet an, dass diese Aminosäure ein Schlüsselement in der Funktion des Kanals ist; sie kann aber nicht allein für die Einwärtsgleichrichtung verantwortlich gemacht werden. Jedoch ist im Moment keine weitere Aminosäure bekannt, welche die Einwärtsgleichrichtung beeinflusst. Eine Strategie für weitere Arbeiten wäre die Kmpv_{SP1} Mutanten F72I R83A K84A K86A elektrophysiologisch zu charakterisieren. Durch den Verlust der positiven Aminosäuren im intrazellulären Eingang wäre es durchaus denkbar, dass K⁺ leichter in den K⁺-Kanal Kmpv_{SP1} gelangen und dadurch eine lineare Leitfähigkeit generiert wird.

Des Weiteren wäre es interessant, die Aminosäure Glutamin an der Stelle 74 in Kmpv_{SP1} genauer zu untersuchen. Denn andere Studien konnten zeigen, dass das Glutamin in Kir2.1 in Anwesenheit positiver geladener Aminosäuren in räumlicher Nähe zur Einwärtsgleichrichtung führen und diese nicht durch einen intrazellulären Block zurückzuführen ist.

Außerdem wurde in dieser Arbeit bisher nur der Einfluss der zweiten TM auf die Gleichrichtung mittels Chimären betrachtet. Es ist allerdings durchaus möglich, dass die erste TM einen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung ausübt. Daher wäre es sinnvoll Chimären zu erstellen, in welcher die erste TM durch entsprechende Aminosäuren von Kmpv₁ ersetzt werden und die Porenregion und die zweite TM von Kmpv_{SP1} stammen.

5. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16(6): 1169-1177
- Ahmed, A., et al. (1999) A molecular target for viral killer toxin: TOK1 Potassium Channels. *Cell* 99(3): 283-291
- Armstrong, C. M. & Binstock, L. (1965) Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.* 48(5): 859-872
- Armstrong, C.M. (1969) Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J. Gen. Physiol.* 54(5): 553-575
- Armstrong, C.M. & Taylor, S.R. (1980) Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30(3): 473-488
- Arnold, K., et al. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2): 195-201
- Ashcroft, F. M. (2000) Ion channels and disease. Academic Press
- Barry, P. H. (1994) JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods* 51(1):107-16
- Bezannila, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80(2): 555-592
- Bernèche, S. & Roux, B. (2001) Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* 414: 73
- Cecchi, X., et al. (1987) Mechanisms of Cs⁺ blockade in a Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *Biophys. J.* 52(5): 707-716
- Chang, H. K; Yeh, S. H. & Shieh, R.C. (2007) Charges in the cytoplasmic pore control intrinsic inward rectification and single-channel properties in Kir1.1 and Kir2.1 channels. *J. Membrane Biol.* 215(2-3): 181-193.
- Chatelain, F. C., et al. (2005) The pore helix dipole has a minor role in inward rectifier channel function. *Neuron* 47(6): 833-843
- Chatelain, F. C., et al. (2009) Selection of inhibitor-resistant viral potassium channels identifies a selectivity filter site that affects barium and amantadine block. *PLoS* 4(10): e7496
- Chen, F. & Suttle, C. A (1996) Evolutionary relationships among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology* 219, 170-178
- Ciani, S., et al. (1978) A model for anomalous rectification: electrochemical-potential-dependent gating of membrane channels. *J. Membrane Biol.* 44(2): 103-134
- Cuello, L. G., et al. (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature* 466(7303): 203-208

-
- Doyle, D. A., et al. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360): 69-77
- Drozdetskiy, A., et al. (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 43: W389-W394
- Fakler, B., et al. (1995) Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 80(1): 149-154
- Fan, Z., et al. (2012) Electrostatic interaction between inactivation ball and T1-S1 linker region of Kv1.4 channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818(1): 55-63
- Fischer, W. B. & Sansom, M. S. (2002) Viral ion channels: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1561(1): 27-45
- Fujiwara, Y. & Kubo, Y. (2002) Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg²⁺. *J. Gen. Physiol.* 120(5): 677-693
- Gay, I. A. & Stanfield, P.R. (1977) Cs⁺ causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal muscle fibres. *Nature* 267(5607): 169-170
- Gazzarrini, S., et al. (2003). The viral potassium channel Kcv: structural and functional features. *FEBS Lett.* 552(1): 12-16
- Gazzarrini, S., et al. (2004) Long distance interactions within the potassium channel pore are revealed by molecular diversity of viral proteins. *J. Biol. Chem.* 279(27): 28443-28449
- Goldenberg, I.; Zareba, W. & Moss, A. J. (2008) Long QT syndrome. *Curr. Probl. Cardiol.* 33(11): 629-694
- Goldman, D. E. (1943) Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27(1): 37-60
- Goutelle, S., et al. (2008) The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22(6): 633-648
- Graham, F. L., et al. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36(1): 59-74
- Grizel, A. V.; Glukhov, G. S. & Sokolova, O. S. (2014) Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae* 6(4): 10-26
- Gunning, R. (1983) Kinetics of inward rectifier gating in the eggs of the marine polychaete, *Neanthes arenaceodentata*. *J. Physiol.* 342: 437-451
- Guo, D. & Lu, Z. (2000) Pore block versus intrinsic gating in the mechanism of inward rectification in strongly rectifying IRK1 channels. *J. Gen. Physiol.* 116(4): 561-568
- Guo, R., et al. (2014) Ionic interactions of Ba²⁺ blockades in the MthK K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 144(2): 193-200
- Hagiwara, S. & Takahashi, K. (1974) The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell *J. Membrane Biol.* 18(1): 61-80
- Hamer, W. J. & Wu, Y-C (1972) Osmotic Coefficients and Mean Activity Coefficients of Uni-univalent Electrolytes in Water at 25Â°C. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Volume 1, Issue 4, p.1047-1100

-
- Heginbotham, L., et al. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66(4): 1061-1067
- Heginbotham, L. & MacKinnon, R. (1993) Conduction properties of the cloned Shaker K⁺ channel. *Biophys. J.* 65(5): 2089-2096
- Hsieh, C-P.; Chiang, C-C.; Huang; C-W. (2016) The mechanism of inward rectification in Kir channels: A novel kinetic model with non-equilibrium thermodynamics approach. *Biophys Chem* 212: 1-8.
- model with non-equilibrium thermodynamics approach
- Hibino, H., et al. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90(1): 291-366
- Hill, A. V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (Lond)* 40: 4-7
- Hill, A. V. (1913) The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biophys. J.* 7(5): 471-480
- Hille, B. (1978) Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys. J.* 22(2): 283-294
- Hille, B. (2001) Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc.
- Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108(1): 37-77
- Hoshi, T.; Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250(4980): 533-538
- Jiang, Y., et al. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423(6935): 33-41
- Jiang, Y. & MacKinnon, R. (2000) The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J. Physiol.* 115(3): 269-272
- Kang, M., et al. (2004) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(15): 5318-5324
- Katz, B. (1949) Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2:285-299
- Katzen, F. (2008) Cell-free protein expression of membrane proteins using nanolipoprotein particles. *Biotechniques* 45(2): 190
- Koster, J. C.; Permutt, M. A. & Nichols, C.G. (2005) Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K⁺ channel (K ATP) connection. *Diabetes* 54(11): 3065-3072
- Kuang, Q., et al. (2015) Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 3677-3693
- Kubo, Y. & Murata, Y. (2001) Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K⁺ channel. *J. Physiol.* 531(Pt 3): 645-660
- Kuo, A., et al. (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300(5627): 1922-1926

-
- Kuo, A., et al. (2005) Prokaryotic K⁺ channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(5): 961-985
- Kurachi, Y. (1985) Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J. Physiol.* 366: 365-385
- Kurata, H. & Fedida, D. (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92(2): 185-208
- Lam, Y. L., et al. (2014) The conserved potassium channel filter can have distinct ion binding profiles: Structural analysis of rubidium, cesium, and barium binding in NaK2K. *J. Gen. Physiol.* 144(2): 181-192
- Lee, C. H. & MacKinnon, R. (2017) Structures of the human HCN1 hyperpolarization-activated channel. *Cell* 168(1-2): 111-120.e111
- LeMasurier, M.; Heginbotham, L. & Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Virol.* 118(3): 303-314
- Lesage, F., et al. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo j* 15(5): 1004-1011
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279(5): F793-801
- Liman, E. R., et al. (1991) Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* 353(6346): 752-756
- Llobet, A., et al. (2001) Identification of Kir2.1 channel activity in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10): 2371-2379
- Long, S. B.; Campbell, E. B. & MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309(5736): 897-903
- Long, S. B., et al. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450: 376
- Lopatin, A. N.; Makhina, E. N. & Nichols, C.G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372(6504): 366-369
- Lopatin, A. N.; Makhina, E. N. & Nichols, C.G. (1995) The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J. Gen. Physiol.* 106(5): 923-955
- Lopatin, A. N. & Nichols, C. G. (1996) K⁺ dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophys. J.* 71(2): 682-694
- Lu, Z. (2004) Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol.* 66: 103-129
- Lu, Z. & MacKinnon, R. (1994) Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature* 371: 243
- MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* 555(1): 62-65
- Makhina, E. N., et al. (1994) Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel. *J. Biol. Chem.* 269(32): 20468-20474

-
- Matsuda, H.; Saigusa, A. & Irisawa, H. (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 325(7000): 156-159
- Morais-Cabral, J. H., et al. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selectivity filter. *Nature* 414: 37
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799
- Nichols, C. G. & Lopatin, A. N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 59(1): 171-191
- Nieva, J. L.; Madan, V. & Carrasco, L. (2012) Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(8): 563-574
- Nishida, M. (2007) Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *Embo J.* 26(17): 4005-4015
- Okada, Y., et al. (2015) Carbenoxolone-sensitive and cesium-permeable potassium channel in the rod cells of frog taste discs. *Biochemistry and Biophysics Reports* 4: 175-179
- Oviedo, C. & Rodríguez, J. (2003) EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova* 26: 901-905
- Ozawa, S.; Iino, M. & Tsuzuki, K. (1991) Two types of kainate response in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 66(1): 2-11
- Papazian, D., et al. (1995) Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in shaker K^+ channel. *Neuron* 14(6): 1293-1301
- Papazian, D., et al. (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305
- Papworth, C.; Greener, A. & Braman, J. (1996) Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* 9 (3), 3-4
- Parsegian, A. (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: Solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221: 844
- Perier, F.; Radeke, C. M. & Vandenberg, C. A. (1994) Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91(13): 6240-6244
- Piasta, K. N.; Theobald, D. L. & Miller, C. (2011) Potassium-selective block of barium permeation through single KcsA channels. *J. Gen. Physiol.* 138(4): 421-436
- Plugge, B., et al. (2000) A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* 287(5458): 1641-1644
- Rauh, O., et al. (2017) Identification of Intrahelical Bifurcated H-Bonds as a New Type of Gate in K^+ Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 139(22): 7494-7503
- Roux, B. (2017) Ion channels and ion selectivity. *Essays Biochem.* 61(2): 201-209
- Sakmann, B. & Trube, G. (1984) Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.* 347: 641-657
- Sansom, M. S., et al. (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim Biophys Acta* 1565(2): 294-307
-

-
- Seoh, S. A. et al. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16(6): 1159-1167
- Siotto, F., et al. (2014) Viruses infecting marine picoplankton encode functional potassium ion channels. *Virology* 466-467: 103-111
- Siotto, F. (2017) Mining and analysis of new viral potassium channel proteins. Dissertation an der Technische Universität Darmstadt
- Standen, N. B. & Stanfield, P. R. (1978) A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J. Physiol.* 280: 169-191
- Swartz, K. J. (2004) Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Rev Neurosci* 5(12): 905-916
- Swartz, K. J. (2008) Sensing voltage across lipid membranes. *Nature* 456(7224): 891-897
- Taglialatela, M., et al. (1994) Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying K⁺ channels. *Science* 264(5160): 844-847
- Tao, X., et al. (2009) Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 -at 3.1 Å resolution. *Science* 326(5960): 1668-1674
- Tao, X., et al. (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science* 328(5974): 67-73
- Tayefeh, S., et al. (2009) Model Development for the Viral Kcv potassium channel. *Biophys. J* 96(2): 485-498
- Thiel, G., et al. (2010) Initial events associated with virus PBCV-1 infection of chlorella NC64A. *Prog Bot* 71(3): 169-183
- Thiel, G., et al. (2011) Minimal art: or why small viral K⁺ channels are good tools for understanding basic structure and function relations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808(2): 580-588
- Thompson, G. A., et al. (2000) Residues beyond the selectivity filter of the K⁺ channel kir2.1 regulate permeation and block by external Rb⁺ and Cs⁺. *Physiol.* 526 Pt 2: 231-240
- Trube, G. & Hescheler, J (1984) Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Arch* 401(2): 178-184
- Vandenberg, C. A. (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2560-2564
- Wang, K.; Xie, S. & Sun, B. (2011) Viral proteins function as ion channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808(2): 510-515
- Winterstein, L-M., et al. (2018) Reconstitution and functional characterization of ion channels from nanodiscs in lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 150 (4): 637
- Woodbury, J. W. (1971) Eyring rate theory model of the current-voltage relationships of ion channels in excitable membranes. *Advances in Chemical Physics: Chemical Dynamics: Papers in Honor of Henry Eyring.* 1971; 21: 601–617.
- Woodhull, A. M. (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61(6): 687-708

-
- Wulff, H.; Castle, N. A. & Pardo, L. A. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8(12): 982-1001
- Xin Liu, G., et al. (2001) Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J. Physiol.* 532(Pt 1): 115-126
- Yamada, M. & Kurachi, Y. (1995) Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit atrial myocytes. Intracellular substance-mediated mechanism of inward rectification. *J. Biol. Chem.* 270(16): 9289-9294
- Yang, J.; Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1995) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron* 14(5): 1047-1054
- Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419(6902): 35-42
- Zhou, M., et al. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414(6859): 43-48
- Zhou, M. & MacKinnon, R. (2004) A mutant KcsA K⁺ channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution. *J. Mol. Biol.* 338(4): 839-846

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Vereinfachter Aufbau eines K^+ -Kanals mit zwei TMs.....	11
Abbildung 1.2: Untereinheiten der K^+ -Kanäle.....	13
Abbildung 1.3: Struktur des K^+ -Kanal KcsA.	14
Abbildung 1.4: Selektivitätsfilter des KcsA.	15
Abbildung 1.5: Selektivität des K^+ -Kanals.....	16
Abbildung 1.6: X-ray Struktur der K^+ -Kanäle KcsA und MthK.	17
Abbildung 1.7: Modell der N-Typ-Inaktivierung an Kv1.4.	18
Abbildung 1.8: Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung am geöffneten-inaktiven KcsA.....	19
Abbildung 1.9: Struktur der Kv-Kanäle.	20
Abbildung 1.10: Modell der Porenstruktur in Kir2.1.	22
Abbildung 1.11: Vergleich des K^+ -Kanals Kir3.1 und des viralen K^+ -Kanals Kmpv _{SP1}	24
Abbildung 3.1: Kmpv _{SP1} zeigt eine Einwärtsgleichrichtung.....	37
Abbildung 3.2: Die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv _{SP1} ist unabhängig von divalenten Kationen und HEPES.	40
Abbildung 3.3: Die Einwärtsgleichrichtung des Kmpv _{SP1} ist unabhängig von divalenten Kationen.....	41
Abbildung 3.4: Einwärtsgleichrichtung des Kmpv _{SP1} bleibt bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen erhalten.	43
Abbildung 3.5: Kmpv _{SP1} verhält sich bei Veränderung der externen K^+ -Konzentration wie Kir-Kanäle.....	45
Abbildung 3.6: Die relative <i>slope</i> Leitfähigkeit des Kmpv _{SP1} verhält sich etwa proportional zur Kubikwurzel der externen K^+ -Konzentration..	46
Abbildung 3.7: Kmpv _{SP1} zeigt eine hohe Sensitivität für extrazelluläres Ba^{2+}	48
Abbildung 3.8: Kmpv _{SP1} zeigt eine hohe Sensitivität für Ba^{2+}	50
Abbildung 3.9: Kmpv _{SP1} ist sensitiv für Cs^+	51
Abbildung 3.10: Kmpv _{SP1} leitet Rb^+ schlechter als K^+	53
Abbildung 3.11: Kmpv _{SP1} leitet kaum Na^+	54
Abbildung 3.12: Alignment der Aminosäure-Sequenzen je einer Untereinheit der viralen K^+ -Kanäle Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁	55
Abbildung 3.13: Kmpv _{SP1} zeigt eine höhere Ba^{2+} -Sensitivität als Kmpv ₁	57

Abbildung 3.14: Die Porenregion ist verantwortlich für die hohe Ba ²⁺ -Sensitivität	59
Abbildung 3.15: Die Porenregion der viralen K ⁺ -Kanäle Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁	60
Abbildung 3.16: Die Aminosäure Serin hinter dem GYG-Motiv ist verantwortlich für die hohe Ba ²⁺ -Sensitivität.	61
Abbildung 3.17: Kmpv ₁ zeigt keine hohe Sensitivität für Cs ⁺	63
Abbildung 3.18: Kmpv _{SP1} ist 2,4-mal sensitiver für Cs ⁺ als Kmpv ₁	64
Abbildung 3.19: Die TMs des Kmpv _{SP1} sind für die hohe Cs ⁺ -Sensitivität verantwortlich.....	65
Abbildung 3.20: Die TMs sind verantwortlich für die hohe Cs ⁺ -Sensitivität.	66
Abbildung 3.21: Kmpv ₁ leitet Rb ⁺ besser als Kmpv _{SP1}	67
Abbildung 3.22: Kmpv ₁ zeigt eine 2,8-fach höhere Leitfähigkeit für Rb ⁺ im Vergleich zu K ⁺ ..	69
Abbildung 3.23: Die TMs sind verantwortlich für die geringe Rb ⁺ -Leitfähigkeit des Kmpv _{SP1} . ..	70
Abbildung 3.24: Kmpv _{SP1} ist ein inhärenter Einwärtsgleichrichter.....	71
Abbildung 3.25: Alignment der Aminosäure-Sequenzen je Untereinheit der viralen K ⁺ -Kanäle Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁	72
Abbildung 3.26: Die TMs sind verantwortlich für die Einwärtsgleichrichtung.	72
Abbildung 3.27: Alignment der Aminosäure-Sequenzen von Kmpv _{SP1} und Kmpv _{PL1}	74
Abbildung 3.28: Kmpv _{PL1} zeigt keine Leitfähigkeit in HEK293-Zellen.	74
Abbildung 3.29: Kmpv _{PL1} zeigt eine Einwärtsgleichrichtung im planaren Lipid-Bilayer.....	75
Abbildung 3.30: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der ersten TMs von Kmpv ₁ , Kmpv _{SP1} und Kmpv _{PL1}	76
Abbildung 3.31: Alle Punktmutationen in der ersten TM führen nicht zum Verlust der Einwärtsgleichrichtung.....	77
Abbildung 3.32: Alle Kmpv _{SP1} Mutanten der ersten TM zeigen eine Einwärtsgleichrichtung..	78
Abbildung 3.33: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM der viralen K ⁺ -Kanäle Kmpv ₁ , Kmpv _{SP1} und Kmpv _{PL1}	79
Abbildung 3.34: Nur Kmpv _{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung.	80
Abbildung 3.35: Nur Kmpv _{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung.	81
Abbildung 3.36: Kmpv _{SP1} F72I zeigt keine Einwärtsgleichrichtung in HEK293-Zellen.....	82
Abbildung 3.37: Kmpv _{SP1} F72I zeigt Schaltereignisse im positiven Spannungsbereich im planaren Lipid-Bilayer.	83
Abbildung 3.38: Kmpv _{SP1} F72I zeigt eine Einwärtsgleichrichtung unter Berücksichtigung der Offenwahrscheinlichkeit.	84

Abbildung 3.39: Kmpv _{PL1} F72I zeigt keine Schaltereignisse im positiven Spannungsbereich im planaren Lipid-Bilayer.	85
Abbildung 3.40: Alanin, Leucin und Tyrosin haben keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung.	87
Abbildung 3.41: Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM von Kmpv _{SP1} , Kmpv ₁ und deren Chimären.	89
Abbildung 3.42: Der C-terminale Teil der zweiten TM hat keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung.	90
Abbildung 3.43: Der C-terminale Teil der zweiten TM hat keinen Einfluss auf die Gleichrichtung.	92
Abbildung 3.44: Aminosäure-Sequenzen der zweiten TM von Wildtyp-Kanälen Kmpv _{SP1} , Kmpv ₁ und deren Chimären.	93
Abbildung 3.45: Die Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1-1 Kmpv ₁ zeigt eine Einwärtsgleichrichtung. ..	94
Abbildung 3.46: Die Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1-1 Kmpv ₁ zeigt eine Einwärtsgleichrichtung. ..	95
Abbildung 4.1: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der K ⁺ -Kanäle Kir2.1, Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁	103
Abbildung 4.2: Ba ²⁺ -Bindestellen im Vergleich.	107
Abbildung 4.3: Homologiemodell des Kmpv _{SP1}	111
Abbildung 4.4: Die positiven Aminosäuren am intrazellulären Ausgang haben keinen Einfluss auf die Einwärtsgleichrichtung.	114
Abbildung 4.5: Kmpv _{SP1} und Kmpv ₁ besitzen an vergleichbarer Stelle ein Glutamin.	115
Abbildung 9.1: Übersicht aller untersuchten Chimären.	137

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 9.1: Mittlere Ströme bei -100 mV und RIs aller Mutanten.....	131
Tabelle 9.2: Mittlere Ströme bei -100 mV und RIs aller Chimären.....	132
Tabelle 9.3: Primer-Sequenzen für die Chimäre TM1 Kmpv _{SP1} / Loop + TM2 Kmpv ₁	132
Tabelle 9.4: Primer-Sequenzen für die Chimäre TM1+2 Kmpv _{SP1} / Loop Kmpv ₁	132
Tabelle 9.5: Primer-Sequenzen für die Chimäre Kmpv _{SP1} / TM2 Kmpv ₁	133
Tabelle 9.6: Primer-Sequenzen für die Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1 Kmpv ₁	133
Tabelle 9.7: Primer-Sequenzen für die ortsgerichtete Mutagenese der Mutanten	133
Tabelle 9.8: Primer-Sequenzen zur Umklonierung von Kmpv ₁ , Kmpv _{PL1} und Kmpv _{SP1} aus pEGFP-N2 in pEXP5-CT/TOPO	135

8. Abkürzungsverzeichnis

a	Aktivität
A	Ampere
Å	Ångström
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium-Ionen
c	Geschlossenzustand
ca.	circa
Cs ⁺	Cäsium-Ionen
ddH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
DH5a	e.coli strain
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosintriphosphat
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Ec	Extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
E _{rev}	Umkehrpotential
E _x	Nernst-Potential für X
F	Faraday constant
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g	slope Leitfähigkeit
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated</i> Kanal
HEK293-Zellen	<i>Human embryonic kidney</i> 293 Zellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)

i	Stromamplitude
I	Zeit-gemittelte Strom
Inh	Inhibition
Ic	intrazellulär
K ⁺	Kalium-Ionen
K ⁺ -Kanal	Kaliumkanal
Kana	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
Kcv	Kaliumkanal aus Chlorellavirus
KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
KCV _{PBCV-1}	Kaliumkanal aus <i>Paramecium Bursaria Chlorella-Virus-1</i>
KCV _{NTS}	Kaliumkanal <i>Chlorella Virus next to smith</i>
Kcv _S	Kaliumkanal <i>Chlorella Virus smith</i>
KirBac	<i>bacterial inwardly rectifying K⁺-Kanal</i>
Kir	<i>Inward rectifying K⁺ channel</i>
Kmpv-Kanäle	K ⁺ -Kanal <i>Micromonas pusilla</i> Virus
Kmpv ₁	K ⁺ -Kanal aus <i>Micromonas pusilla</i> RCC1109 virusMpV1
Kmpv _{12T}	K ⁺ -Kanal aus <i>Micromonas pusilla</i> virus 12T
Kmpv _{PL1}	K ⁺ -Kanal aus <i>Micromonas pusilla</i> PL1
Kmpv _{SP1}	K ⁺ -Kanal aus <i>Micromonas pusilla</i> SP1
Kv	spannungsabhängige K ⁺ -Kanäle
KvAP	spannungsabhängige K ⁺ -Kanal aus <i>Aeropyrum pernix</i>
K2P	<i>Two-Pore domain</i> K ⁺ -Kanäle
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LQTS	<i>Long QT-Syndrom</i>
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
m	Milli
M	Molar
mm	Millimeter
MthK	Ca ²⁺ -gesteuerter K ⁺ - Kanal aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>

mV	Millivolt
n	Anzahl (z.B. unabhängiger Messungen)
n	Nano
Na ⁺	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
OH	Hydroxid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NLP	<i>nanolipoprotein particles</i>
p	Pico
P _o	Offenwahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline solution
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pfu	Enzym aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
R	Gaskonstante
RI	Rektifizierungs-Index
Rb ⁺	Rubidium-Ionen
RbCl	Rubidiumchlorid
s	Sekunden
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i>
SOC-Medium	<i>Super optimal Broth-Medium</i>
T	absolute Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMs	Transmembran-Helices
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Z	Anzahl der übertragenen Elektronen
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro

9. Anhang

9.1. Mittlere Ströme und RIs bei -100 mV

Tabelle 9.1: Mittlere Ströme bei -100 mV und RIs aller Mutanten

1 TM	mittlere Strom bei -100 mV / pA	RI	n
untransfizierte HEK293-Zellen	-58,86 ± 66,60	4,02 ± 2,88	18
Kmpv _{SP1}	-862,19 ± 554,73	0,40 ± 0,17	64
Kmpv ₁	-555,62 ± 357,44	1,158 ± 0,21	55
Kmpv _{SP1} Δ 2-4	-177,76 ± 56,69	0,53 ± 0,06	3
Kmpv _{SP1} D5K	-724,77 ± 418,55	0,467 ± 0,16	6
Kmpv _{SP1} K6T	-2214,73 ± 380,18	0,39 ± 0,04	3
Kmpv _{SP1} F7V	- 726,99 ± 402,8	0,45 ± 0,12	7
Kmpv _{SP1} K8L	-2855,34 ± 590,73	0,37 ± 0,14	6
Kmpv _{SP1} L9N	-1437,02 ± 736,56	0,28 ± 0,07	4
Kmpv _{SP1} V13I	-966,39 ± 564,27	0,44 ± 0,06	4
Kmpv _{SP1} A14T	-1346,66 ± 850,40	0,33 ± 0,02	5
Kmpv _{SP1} L15T	-208,93 ± 43,40	0,47 ± 0,08	3
Kmpv _{SP1} R59A	-223,56 und -247,63	0,3 und 0,3	2
Kmpv _{SP1} L63V	-428,23 ± 221,16	0,52 ± 0,06	5
Kmpv _{SP1} T66S	-1555,95 ± 655,92	0,32 ± 0,15	3
Kmpv _{SP1} Q68H	-226,95 ± 152,09	0,50 ± 0,08	3
Kmpv _{SP1} F70V	-556,26 ± 117,02	0,38 ± 0,10	4
Kmpv _{SP1} I71M	-1001,21 ± 621,55	0,49 ± 0,09	6
Kmpv _{SP1} F72I	-172,25 ± 111,96	1,30 ± 0,34	15
Kmpv _{SP1} F72L	-412,31 ± 363,66	0,65 ± 0,11	3
Kmpv _{SP1} F72Y	-230,29 ± 134,60	0,50 ± 0,15	11
Kmpv _{SP1} F72A	-898,98 ± 634,26	0,62 ± 0,06	5
Kmpv _{SP1} I75L	-733,98 ± 280,31	0,35 ± 0,13	3
Kmpv _{SP1} L76A	-98,4	0,8	1
Kmpv _{SP1} Δ83-86	-396,91 ± 290,39	0,73 ± 0,18	3

Tabelle 9.2: Mittlere Ströme bei -100 mV und RIs aller Chimären

2 TM	mittlere Strom bei -100 mV / pA	RI	n
untransfizierte HEK293-Zellen	-58,86 ± 66,60	4,02 ± 2,88	18
Kmpv _{SP1}	-862,19 ± 554,73	0,40 ± 0,17	64
Kmpv ₁	-555,62 ± 357,44	1,16 ± 0,21	55
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2 Kmpv ₁	-7,14±5,19	1,92±0,63	16
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1 Kmpv ₁	-13,21±12,95	1,23±0,62	7
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-2 Kmpv ₁	-186,73±108,97	0,56±0,08	4
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1-1 Kmpv ₁	-306,75±225,77	0,48±0,22	4
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1-2 Kmpv ₁	-10,5±16,18	3,42±2,27	7

9.2. Primer-Sequenzen

Tabelle 9.3: Primer-Sequenzen für die Chimäre TM1 Kmpv_{SP1}/ Loop + TM2 Kmpv₁

PCR	Template	5'→3'	3'→5'
1.	Kmpv _{SP1}	CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	ATG TTC TGG TTT CAT TCT GCT ATA AAT AAA
2.	Kmpv ₁	ATG AAA CCA GAA CAT TTC AAT	CGG AAT TCA AAA ATC TTT AAA ATT TT
3.		CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	CGG AAT TCA AAA ATC TTT AAA ATT TT

Tabelle 9.4: Primer-Sequenzen für die Chimäre TM1+2 Kmpv_{SP1}/ Loop Kmpv₁

PCR	Template	5'→3'	3'→5'
1.	Chimäre TM1 Kmpv _{SP1} / Kmpv ₁	CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	TAG CAA CTT CGC ACG ATC TGT CTT GGG AGA
2.	Kmpv _{SP1}	CGT GCG AAG TTG CTA GTA ATG	CGG AAT TCC TTA CTT TTT CGT TTA AAC AT
3.		CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	CGG AAT TCC TTA CTT TTT CGT TTA AAC AT

Tabelle 9.5: Primer-Sequenzen für die Chimäre Kmpv_{SP1}/ TM2 Kmpv₁

PCR	Template	5'→3'	3'→5'
1.	Kmpv _{SP1}	CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	AGT TCA GGG TTC TGC CTA CGA CGC TTT AAC CAC CAT
2.	Kmpv ₁	TCA AGT CCC AAG ACG GAT GCT GCG AAA TTG GTG GTA	ATG AAA CCA GAA CAT TTC AAT
3.		CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	ATG AAA CCA GAA CAT TTC AAT

Tabelle 9.6: Primer-Sequenzen für die Chimäre Kmpv_{SP1}/TM2-1 Kmpv₁

PCR	Template	5'→3'	3'→5'
1.	Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2 Kmpv ₁	CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	GTC GTA GAC CAC TAC TAA CCA CTT ATT TTA AAG TTG
2.	Kmpv _{SP1}	CAG CAT CTG GTG ATG ATT GGT GAA TAA AAT TTC AAC	CGG AAT TC AAA AAT CTT TAA AAT TTT
3.		CCG CTC GAG ATG ACA CCC ATA GAT	CGG AAT TC AAA AAT CTT TAA AAT TTT

Tabelle 9.7: Primer-Sequenzen für die ortsgerichtete Mutagenese der Mutanten

Mutante	5'→3'	3'→5'
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-2 Kmpv ₁	CC CAA CAG GTA TTC ATT TTT GGA GAA TTG GCT AAA ATT TTA AAG ATT TTT GAA TTC TGC AGT CGA CGG TA	TA CCG TCG ACT GCA GAA TTC AAA AAT CTT TAA AAT TTT AGC CAA TTC TCC AAA AAT GAA TAC CTG TTG GG
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1- 1 Kmpv ₁	AGT CCC AAG ACG GAT GCT GCG AAA TTG GTG GTA ATG ACC CAA CAG GTA TTC	GAA TAC CTG TTG GGT CAT TAC CAC CAA TTT CGC AGC ATC CGT CTT GGG ACT
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-1- 2 Kmpv ₁	AAG TTG CTC GTA ATG TCT CAG CAT CTG GTG ATG ATT GGT GAA ATT TTA AAG	CTT TAA AAT TTC ACC AAT CAT CAC CAG ATG CTG AGA CAT TAC TAG CAA CTT
Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-2- 1 Kmpv ₁	CAG GTA TTC ATT TTT GGA GAA TTG GCT AAA TTG TTA ATG TTT AAA	TTT AAA CAT TAA CAA TTT AGC CAA TTC TCC AAA AAT GAA TAC CTG

Chimäre Kmpv _{SP1} /TM2-2- 2 Kmpv ₁	GGT GAA ATT TTA AAG ATT TTA AAG ATT TTT GAA TTC TGC AGT CGA	TCG ACT GCA GAA TTC AAA AAT CTT TAA AAT CTT TAA AAT TTC ACC
Kmpv _{SP1} Δ2-4	GAT CTC GAG ATG GAT AAA TTT AAA CTT	AAG TTT AAA TTT ATC CAT CTC GAG ATC
Kmpv _{SP1} D5K	ATG ACA CCC ATA AAG AAA TTT AAA CTT	AAG TTT AAA TTT CTT TAT GGG TGT CAT
Kmpv _{SP1} K6T	ACA CCC ATA GAT ACT TTT AAA CTT ATT	ATT AAG TTT AAA AGT ATC TAT GGG TGT
Kmpv _{SP1} F7V	CCC ATA GAT AAA GTA AAA CTT ATT GTA	TAC AAT AAG TTT TAC TTT ATC TAT GGG
Kmpv _{SP1} K8L	GAT AAA TTT TTG CTT ATT GTA ATT	AAT TAC AAT AAG CAA AAA TTT ATC
Kmpv _{SP1} L9N	AAA TTT AAA AAC ATT GTA ATT GTC	GAC AAT TAC AAT GTT TTT AAA TTT
Kmpv _{SP1} V13I	CTT ATT GTA ATT ATC GCA TTG TTA TAC	GTA TAA CAA TGC GAT AAT TAC AAT AAG
Kmpv _{SP1} A14T	GTA ATT GTC ACG TTG TTA TAC GGT	ACC GTA TAA CAA CGT GAC AAT TAC
Kmpv _{SP1} L15T	GTA ATT GTC GCA ACA TTA TAC GGT	GTA ATT GTC GCA ACA TTA TAC GGT
Kmpv _{SP1} R59A	CCC AAG ACG GAT CGT GCG AAG TTG CTA	TAG CAA CTT CGC ACG ATC CGT CTT GGG
Kmpv _{SP1} L63V	CGT GCG AAG TTG GTG GTA ATG ACC	GGT CAT TAC CAC CAA CTT CGC ACG
Kmpv _{SP1} L66S	TTG CTA GTA ATG AGC CAA CAG GTA TTC	GAA TAC CTG TTG GCT CAT TAC TAG CAA
Kmpv _{SP1} Q68H	CTA GTA ATG ACC CAA CAC GTA TTC ATT	AAT GAA TAC GTG TTG GGT CAT TAC TAG
Kmpv _{SP1} F70V	AGT ACC CAA CAG GTA GTC ATT TTT GGT	ACC AAA AAT GAC TAC CTG TTG GGT ACT

Kmpv _{SP1} I71M	ACC CAA CAG GTA TTC ATG TTT GGT GAA	TTC ACC AAA CAT GAA TAC CTG TTG GGT
Kmpv _{SP1} F72I	CAA CAG GTA TTC ATT ATC GGT GAA ATT	AAT TTC ACC GAT AAT GAA TAC CTG TTG
Kmpv _{SP1} F72A	CAA CAG GTA TTC ATT GCG GGT GAA ATT	AAT TTC ACC CGC AAT GAA TAC CTG TTG
Kmpv _{SP1} F72L	CAA CAG GTA TTC ATT TTG GGT GAA ATT	AAT TTC ACC AAC AAT GAA TAC CTG TTG
Kmpv _{SP1} F72Y	CAA CAG GTA TTC ATT TAC GGT GAA ATT	AAT TTC ACC GTA AAT GAA TAC CTG TTG
Kmpv _{SP1} I75L	TTC ATT TTT GGT GAA CTC TTA AAG TTG	CAA CTT TAA GAG TTC ACC AAA AAT GAA
Kmpv _{SP1} L76A	TTT GGT GAA ATT GCG AAG TTG TTA ATG	CAT TAA CAA CTT CGC AAT TTC ACC AAA
Kmpv _{SP1} Δ83-86	TTA ATG TTT AAA GAA TTC TGC AGT CGA	TCG ACT GCA GAA TTC TTT AAA CAT TAA
Kmpv _{PL1} F72I	CAG GCG TTC ATT ATT GGT GAA ATA TTA	TAA TAT TTC ACC AAT AAT GAA CGC CTG

Tabelle 9.8: Primer-Sequenzen zur Umklonierung von Kmpv₁, Kmpv_{PL1} und Kmpv_{SP1} aus pEGFP-N2 in pEXP5-CT/TOPO

	5'→3'	3'→5'
Kmpv _{SP1}	ATG ACA CCC ATA GAT AAA TTT AAA	CTA CTT ACT TTT TCG TTT AAA CAT TAA
Kmpv _{PL1}	ATG ACA CCT ATA GAT AAA TTC AAA	CTA CTT AGA AAA CTC TTT AAT CAA TAC
Kmpv ₁	ATG AAG ACT GTA TTG AAC ATT CTT	CTA AAA AAT CTT TAA AAT TTT AGC CAA

9.3. Basensequenzen und Aminosäure-Sequenzen

9.3.1. Kmpv_{SP1}

MTPIDKFKLIVIVALLYGFIYSRMDPEEFGFSSPLDPYYFSFTTMSSVGYGDDSSPKTDRAKLLVMTQQV
FIFGEILKLLMFKRKSK

5' → 3'

ATGACACCCATAGATAAAATTTAACTTATTGTAATTGTCGCATTGTTATACGGTTTTATTTATAG
CAGAATGGATCCAGAGGAGTTTGGATTCAGCTCACCCCTCGACCCATATTACTTTTCTTTCACCTA
CTATGAGTAGTGTAGGCTATGGTGACTCAAGTCCCAAGACGGATCGTGCGAAGTTGCTAGTAAT
GACCCAACAGGTATTCATTTTTTGGTGAAATTTTAAAGTTGTTAATGTTTAAACGAAAAAGTAAG

9.3.2. Kmpv₁

MKTVLNILIIITTLYGLLYSKMKPEHFNFKSPLDPFYFSFTTMSSVGYGDFSPKTDAAKLVVMSQHLVM
IGELAKILKIF

5' → 3'

ATGAAGACTGTATTGAACATTCTTATCATCACGACACTGTATGGTCTTTTGTACAGCAAGATGA
AACCAGAACATTTCAATTTCAAGAGCCCCCTAGACCCTTTCTACTTTTCTTTCACGACCATGTGC
AGTGTGGGCTACGGCGACTTCTCTCCCAAGACAGATGCTGCGAAATTGGTGGTAATGTCTCAGC
ATCTGGTGATGATTGGAGAATTGGCTAAAATTTTAAAGATTTTT

9.3.3. Kmpv_{PL1}

MTPIDKFKLVITVALLYGYLYSLMEPEEFGFKTALDPYYFSFTTMSSVGYGDFSPITGRAKMLAMTQQ
AFIFGEILKVLIKEFSK

5' → 3'

ATGACACCTATAGATAAAATTCAAACTTGTTATAACTGTCGCACTATTATATGGTTATCTTTATAG
TTTGATGGAACCAGAGGAGTTTGGCTTCAAGACGGCTCTCGATCCTTACTATTTTTCTTTCACG
ACTATGAGTAGTGTGGGTACGGTGACTTTAGTCCCATACGGGACGTGCGAAGATGTTAGCAA
TGACCCAACAGGCGTTCATTTTTTGGTGAAATATTAAAGGTATTGATTAAAGAGTTTTCTAAG

9.4. Übersicht der Chimären






Kmpv ₁	TM1	TM2	
Kmpv _{SP1}			
TM1 + 2 Kmpv _{SP1} /Loop Kmpv ₁			
Kmpv _{SP1} /TM2 Kmpv ₁			Kein Strom
Kmpv _{SP1} /TM2 - 1 Kmpv ₁			Kein Strom
Kmpv _{SP1} /TM2 - 2 Kmpv ₁			
Kmpv _{SP1} /TM2 - 1 - 1 Kmpv ₁ _h			
Kmpv _{SP1} /T 2 - 1 - 2 Kmpv ₁			Kein Strom

Abbildung 9.1: Übersicht aller untersuchten Chimären. Kmpv₁ ist in grün und Kmpv_{SP1} in blau dargestellt. Die jeweiligen Anteile der Chimären sind mit den entsprechenden Farben markiert. Die angedeuteten Strom-Spannungskurven geben an, ob eine Einwärtsgleichrichtung, eine ohmsche Leitfähigkeit oder kein Strom in einer K⁺-Lösung generiert wurde.

9.5. Aminosäuren

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glyzin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valin	V	Val

10. Eigene Arbeit

Experimente, Datenanalyse und das Schreiben der vorliegenden Arbeit wurden von mir selbst mit folgenden Ausnahmen durchgeführt:

- Die Einzelkanalmessungen des viralen K^+ -Kanals Kmp_{VSP1} in An- und Abwesenheit von EDTA und HEPES in Kapitel 3.1 (Abbildung 3.1 E und F, Abbildung 3.2 und 3.3) wurden von Tobias Schulze (Masterstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Einige statistische *Patch-Clamp* Messungen von Kmp_{VSP1} bei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen, in Kapitel 6.1, wurden von Julian Stahl (Masterstudent) durchgeführt.
- Die Einzelkanalmessungen des viralen K^+ -Kanals Kmp_{V1} in 50 mM externer K^+ -Lösung in Kapitel 3.2.3 (Abbildung 3.22 A, C und D) wurden von Tobias Schulze (Masterstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Die Herstellung der Punktmutation Kmp_{VSP1} R59A durch SDM und ihre elektrophysiologische Untersuchung mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik, in Kapitel 3.3.1 (Abbildung 3.34), wurde von Julian Stahl (Bachelorstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Die Herstellung der Punktmutation Kmp_{VSP1} F72I und Kmp_{VPL1} F72I durch SDM und ihre elektrophysiologische Untersuchung mit Hilfe der Lipid-Bilayer Technik, in Kapitel 3.3.1 (Abbildung 3.37, 3.38 und 3.39), wurde von Tobias Schulze (Masterstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Die Herstellung der Punktmutation Kmp_{VSP1} F72Y durch SDM und ihre elektrophysiologische Untersuchung mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik, in Kapitel 3.3.1 (Abbildung 3.40), wurde von Yvonne Fischer (Bachelorstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Die Herstellung der Chimären Kmp_{VSP1}/ TM2 Kmp_{V1}, Kmp_{VSP1}/ TM2-1 Kmp_{V1} und Kmp_{VSP1}/ TM2-2 Kmp_{V1} durch SDM oder Chimären-PCR und ihre elektrophysiologische Untersuchung mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik, in Kapitel 3.3.1 (Abbildung 3.42), wurden von Tobias Marr (Bachelorstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.
- Einige statistische *Patch-Clamp* Messungen der Chimären Kmp_{VSP1}/ TM2-1-2 Kmp_{V1} mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik, in Kapitel 3.3.1 (Abbildung 3.42), wurde von Julian Stahl (Masterstudent), unter meiner Betreuung, durchgeführt.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 11.10.2018

12. Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Name	Eckert
Vorname	Denise
Geburtsdatum-, ort	30.12.1988, Groß-Umstadt
Nationalität	German

Ausbildungen und berufliche Erfahrungen

09/2015-12/2018:	Promotion Fachbereich Biologie, AG Thiel <i>Plant Membrane Biophysics</i> , Technischen Universität Darmstadt
10/2013-08/2015	Master of Science Technische Biologie Fachbereich Biologie, AG Thiel, TU Darmstadt Thema: „Mutationsstudien zur Struktur-Funktionsanalyse der viralen Kaliumkanäle Kmpv ₁ und Kmpv _{SP1} .“
10/2010-04/2011	Ausbildung zur Rettungsassistentin
10/2009-10/2013	Bachelor of Science Biologie Fachbereich Biologie, AG Laube, TU Darmstadt Thema: „Einfluss ionisierender Strahlung auf das glutamaterge System von Glioblastomzellen mittels Western Blot“.
11/2008-10/2009	Freiwilliges soziales Jahr im Rettungsdienst Odenwaldkreis
06/2008-09/2008	Ausbildung zur Rettungssanitäterin
2008	Abitur an der Georg-August-Zinn-Schule, Reichelsheim (Odenwald)

Publikationen

Denise Eckert, Tobias Schulze, Fenja Siotto, Anna Moroni, Indra Schroeder, Gerhard Thiel, "A small viral K⁺ channel with an inherent inward rectification" (in Bearbeitung)

Konferenzen

- "Biophysics and Medicine of Channels and Transporters: Electrifying New Insights", Erice, Italy, 14.-20. Mai 2017

Posterpräsentation: "The viral K⁺ channel Kmpv_{SP1} possesses an intrinsic inward rectification"

- "International workshop - Proton and Proton-coupled Transport", Berlin, Deutschland, 27.-29. Mai 2016

Posterpräsentation: "Structure/function analysis of the two viral K⁺ channels Kmpv₁ and Kmpv_{SP1} by mutagenesis"

13. Danksagung

Ich möchte mich nochmal ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an ...

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Betreuung dieser spannenden Arbeit, sein offenes Ohr für alle Fragen und seine immer freundliche und ermutigende Art.

Herrn Prof. Dr. Bertl für die Übernahme des Koreferats.

Meine Studenten **Yvonne Fischer, Julian Stahl, Tobias Schulze und Tobias Marr** für die großartige Zusammenarbeit und die gelungenen Messungen.

Frau Dr. Indra Schröder und Herrn Dr. Oliver Rauh für eure Unterstützung bei allen Fragen und eure erstaunliche Art und Weise auch schwierige Inhalte verständlich zu erklären.

Frau Dr. Brigitte Hertel für deine Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Die vielen schönen Spaziergänge im botanischen Garten und die tollen gemeinsamen Praktikas, welche wir zusammen organisiert haben.

Marina Kithil für die Freundschaft und die schöne Zusammenarbeit.

Mirja Manthey für die schönen Zellen und deine freundliche und aufmunternde Art.

Silvia Haase für die Bestellungen, **Silvia Lenz** für die Hilfe im Labor, **Barbara Reinhardt** und **Tanja Musielak** für die Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Das **Kinderzimmer** und die gesamte **AG Thiel** für die lustige und schöne Zeit. Es war eine tolle und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre mit vielen lustigen Freizeitaktivitäten.

Meinen **Freunden** für euer Verständnis und eure Unterstützung und dass ihr immer für mich da seid.

Meinen **Eltern** und meinem Bruder **Dominik**, dass ihr mich immer unterstützt, an mich geglaubt und mich in schwierigen Situationen ermutigt habt. Selbstverständlich auch an meinen Freund **Thomas Roth**, da du immer für mich da bist.